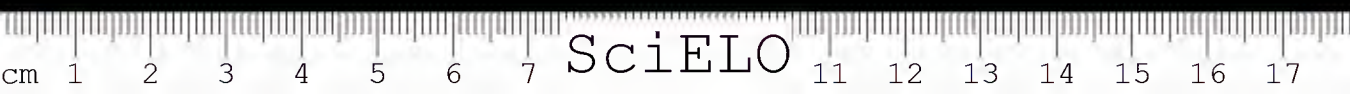
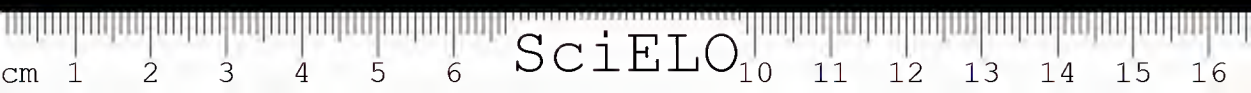
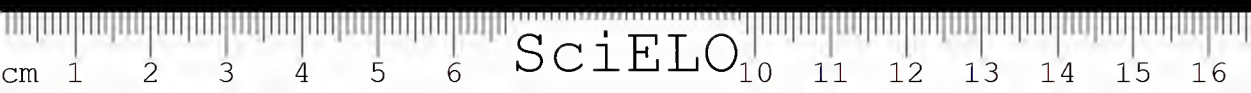
Memórias do Instituto Butantan

vol. 39/1975

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE - COORDENADORIA DE SERVIÇOS TÉCNICOS ESPECIALIZADOS
INSTITUTO BUTANTAN SÃO PAULO BRASIL

Memórias do Instituto Butantan

vol. 39/1975

Toda correspondência editorial
deve ser dirigida à:

Biblioteca do Instituto Butantan
Avenida Vital Brazil, 1500 - caixa postal 65
05504 - São Paulo, SP - Brasil

Memórias do Instituto Butantan. São Paulo, SP
Brasil, 1918

1918-1974, **1-38**
1975, **39**

○

Publicação anual / Annual publication
Solicita-se permuta / Exchang desired

Serão fornecidas separatas dos trabalhos publicados nas "Memórias do Instituto Butantan", solicitando-se nesse caso o obséquio de enviar outras separatas, em permuta, para a Biblioteca do Instituto.

Memórias do Instituto Butantan

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

1 — *FINALIDADE*

As MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN são publicadas sob a orientação da Comissão Editorial, sendo que os conceitos emitidos são de inteira responsabilidade dos autores. Tem por finalidade a apresentação de trabalhos originais que contribuam para o progresso nos campos da Biologia e da Medicina, elaborados por especialistas nacionais ou estrangeiros que se enquadrem no Regulamento dos Trabalhos.

2 — *REGULAMENTO DOS TRABALHOS*

2.1 — *Normas gerais*

2.1.1 Os trabalhos devem ser inéditos e destinar-se exclusivamente à revista "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN". Os artigos serão publicados a convite da Comissão Editorial.

2.1.2 *Estrutura do Trabalho*

2.1.2.1 *Elementos preliminares*

a) cabeçalho — título do trabalho e nome do autor (es);
b) filiação científica e endereço para correspondência.

2.1.2.2 *Texto*

Sempre que possível deve obedecer à forma convencional do artigo científico:

a) *Introdução* — estabelecer com clareza o objetivo do trabalho, relacionando-o com outros do mesmo campo e apresentando de forma sucinta a situação que se encontra o problema investigado, Extensas revisões de literatura devem ser substituidas por referências aos trabalhos mais re-

centes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

b) *Material e métodos* — A descrição dos métodos usados deve limitar-se ao suficiente para possibilitar ao leitor a perfeita compreensão e repetição dos métodos; as técnicas já descritas em outros trabalhos devem ser referidas somente por citação, a menos que tenham sido consideravelmente modificadas.

c) *Resultados* — Devem ser apresentados com clareza e, sempre que necessário, acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado.

d) *Discussão* — Deve restringir-se à apresentação dos dados obtidos e dos resultados alcançados, relacionando-se novas contribuições aos conhecimentos anteriores. Evitar hipóteses ou generalizações não baseadas nos resultados do trabalho.

e) *Conclusões* — Devem ser fundamentadas no texto.

Dependendo do assunto do artigo, as divisões acima poderão ser modificadas de acordo com o esquema do trabalho, porém, o artigo deve conter obrigatoriamente:

a) Introdução;
b) Desenvolvimento do tema (com as divisões a critério do autor);
c) Conclusão.

2.1.2.3 *Agradecimentos*

Devem ser mencionados antes das Referências Bibliográficas.

2.1.2.4 *Material de Referência*

Todo trabalho deve vir obrigatóriamente acompanhado de:

a) *Resumo* — Um no mesmo idioma do texto, outro em inglês, redigidos pelo(s) próprio(s) autor(es), devendo expressar o conteúdo do artigo, salientando os elementos novos e indicando sua importância. O resumo na lingua em que está redigido o trabalho deve ser colocado antes do texto; e o em inglês, no final. Só excepcionalmente excederá a 200 palavras. Os títulos dos trabalhos devem ser traduzidos para o inglês e vice-versa.

b) *Unitermos* — Correspondendo a palavras ou expressões que identifiquem o conteúdo, devem ser em número necessário pa-

ra a completa descrição do assunto e assinalados com asteríscos (*) os 3 unitermos principais. Para escolha dos unitermos usar o vocabulário protótipo do campo especializado.

c) *Referências Bibliográficas* — Devem ser incluídas apenas as referências mencionadas no texto e arranjadas em ordem alfatica do sobrenome do autor, numeradas consecutivamente.

Periódico:

AMORIM, M. de F.; MELLO, R.F. & SALIBA, F. Envenenamento botrópico e crotálico. Contribuição para o estudo experimental comparado das lesões. *Mem. Inst. Butantan, 23*: 63-107, 1950-51.

Livro:

BIER, O. Bacteriologia e Imunologia. 1, 13.ª ed. São Paulo, Melhoramentos, 1966.

As citações no texto devem ser em números índices correspondendo às respectivas referências bibliográficas.

Exemplos:

As investigações sobre a fauna flebotomínica no Estado de São Paulo, foram feitas em várias ocasiões [1, 3, 4] ....
... método derivado de simplificação de armadilha de Disney[2] (1968)...

Referências Bibliográficas (correspondentes aos números índices)

1. BARRETO, M.P. Observações sobre a biologia em condições naturais dos flebótomos do Estado de São Paulo (Diptera, Psychodidae). São Paulo, 1943 (Tese, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo).

2. DISNEY, R.H.L. Observations on a zoonosis: lishmaniosis in British Honduras. *J. appl. Ecol., 5*: 1-19, 1968.

3. FORATTINI, O.P. Algumas observações sobre biologia dos flebótomos (Diptera, Psychodidae) em região da bacia do Rio Paraná (Brasil). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 8*: 15-136, 1954.

4. FORATTINI, O.P. Novas observações sobre biologia de flebótomos em condições naturais (Diptera, Psychodidae). *Arq. Fac. Hig. S. Paulo, 25*: 209-215, 1960.

3 — *NORMAS PARA APRESENTAÇÃO DOS ORIGINAIS*

3.1 — *Datilografia*

Os originais devem ser datilografados, em 3 (três) vias, com espaço duplo, em uma só face, mantendo as margens laterais com

3 cm aproximadamente. Todas as páginas devem ser numeradas consecutivamente, com algarismos arábicos, no canto superior direito.

3.2 — *Tabelas*

Devem ser numeradas consecutivamente com algarismos arábicos e encabeçadas pelo seu título. Os dados apresentados em tabela não devem ser, em geral, repetidos no texto. As notas de rodapé das tabelas devem ser restritas ao mínimo possível e referidas por asteríscos.

3.3 — *Ilustrações* (fotografias, desenhos, gráficos, etc.)

3.3.1 Todas as ilustrações devem ser coladas numa extensão de 2 cm na parte superior de um papelão um pouco maior.

3.3.2 Para melhor proteção cobrir a ilustração com papel vegetal de comprimento um pouco maior que o papelão, de maneira a poder ser dobrado para trás na parte superior e colado.

3.3.3 Tôda e qualquer anotação deve ser feita sobre o papel vegetal em letra de forma e algarismo arábicos com a precaução de não calcar muito a fim de não marcar as ilustrações.

3.3.4 As fotos devem ser entregues inteiras e não recortadas, em papel fotográfico liso não abrilhantado. Limitar com um traço no papel vegetal a parte importante da foto; não colocar letras ou números sobre as fotos, mas sim sobre o papel vegetal.

3.3.5 Os desenhos e gráficos devem ser feitos com tinta nankin preta em papel Schoeller Hammer 3G ou 4G, ou equivalente. O tamanho dos desenhos e gráficos quando ocupar página inteira deve ser no mínimo de 12,6 x 19,8 cm, podendo ser proporcionalmente maior até atingir ao máximo de duas vezes aquela dimensão.

3.3.6 A numeração das ilustrações será feita com algarismos arábicos na parte inferior do papel vegetal. Quanto aos demais elementos necessários à identificação das ilustrações (número, nome do autor e título do trabalho), devem ser escritos atrás do papelão em que as mesmas estiverem coladas.

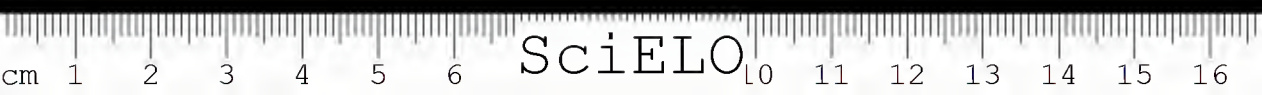
3.3.7 As legendas devem ser apresentadas à parte em folhas datilografadas, constando a numeração correspondente à ilustração.

A Revista admite até 6 clichês (branco e preto) no texto, para cada trabalho, devendo os demais ser pagos pelo autor. Para clichês coloridos deverá haver prévia combinação entre a Comissão Editorial e o autor.

De cada trabalho serão impressas 100 (cem) separatas, devendo o autor pagar as separatas que excedam a esse número, quando solicitar uma quantidade maior. As separatas em Excesso devem ser solicitadas quando o manuscrito for encaminhado à Comissão Editorial.

Os trabalhos poderão ser redigidos, além da língua portuguesa, em: inglês, francês e espanhol. Outras linguas ficarão a critério da Comissão Editorial.

A reprodução total ou parcial dos trabalhos em outros periódicos — *com menção obrigatória da fonte* — dependerá de autorização prévia da Comissão Editorial.

Para fins comerciais será proibida a tradução e reprodução dos trabalhos publicados pela revista.

Memórias do Instituto Butantan

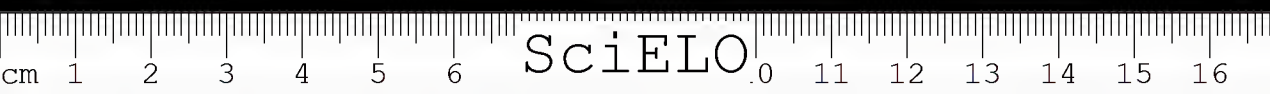
CONTEÚDO/CONTENTS

APRESENTAÇÃO

O presente volume das "Memórias do Instituto Butantan" representa justa homenagem a Afrânio do Amaral, herpetologista de renome internacional, pelo importante papel que desempenhou na vida do Instituto em momento crítico de sua existência e pelos relevantes serviços que lhe prestou, através de um período longo de administração operosa e fecunda.

O trabalho introdutório, de autoria de Edgard C. Falcão, é um relance biográfico da carreira científica de Afrânio do Amaral. Os demais artigos, em sua maioria de pesquisadores do Instituto Butantan, foram cuidadosamente selecionados para este volume, situando-se predominantemente no campo da Zoologia, particularmente dos Animais Peçonhentos — especialidade à qual o homenageado dedicou a maior parte de sua atividade científica.

AFRANIO DO AMARAL

Mem. Inst. Butantan
39: 3-9, 1975

BREVE NOTICIA SOBRE A VIDA CIENTÍFICA DE AFRÂNIO DO AMARAL. *

EDGARD C. FALCÃO

INTRODUÇÃO

Há mais de um século atrás, precisamente em meado da década oitocentista de 60, ou seja, no ano de 1865, instituiu-se na Cidade do Salvador, Bahia de Todos os Santos, um círculo de estudos médicos de alto nível, composto de meia dúzia de facultativos, que, após a afanosa labuta diária, ainda tinha tempo e ânimo para trocar idéias acerca dos casos clínicos mais curiosos e educativos, que se lhes antolhavam.

Desse grupo, que se reunia quinzenal e revezadamente em casa de cada um deles, três elementos se distinguiram sobremaneira: um médico escocês, formado em Aberdeen (Inglaterra) e radicado na Bahia havia mais de vinte ânos, John Lidgertwood Paterson, idealizador e animador de tais tertúlias; um alemão, que se diplomara em medicina pela Universidade de Tübingen (Wurtenberg), Otto Edward Henry Wucherer, que também morava na capital baiana há mais de três lustros, tendo trazido da Alemanha a prática do microscópio e do escalpelo; e, finalmente, um português, emigrado adolescente, natural duma aldeia d'além-mar (Vilarinho), e que, no espaço apenas de onze anos, completara estudos de humanidades e fizera todo o curso médico na Faculdade da Bahia, diplomando-se no ano de 1851. Chamava-se José Francisco da Silva Lima, e veio a tornar-se o expoente máximo da profissão naquele meio, durante toda a segunda metade de oitocentos.

Wucherer, levando vantagem sobre os demais, pelos conhecimentos práticos de microscopia e anatomia patológica, teve oportunidade de iniciar estudos de medicina experimental na Bahia, sagrando-se pioneiro nesse campo de investigações em todo o Brasil. Duas grandes descobertas conseguiu realizar em menos de três anos: 1.ª) A demonstração do papel etiológico do *Ancylostoma duodenale* na hipoemia inter-tropical (opilação ou cansaço) em 1865-66; 2.ª) A descoberta dum verme ainda não descrito, sob a forma de embriões (microfilárias), em urinas hematúricas e hêmato-quilúricas, no dia 4 de Agosto de 1866, verme esse mais tarde identificado sob a forma adulta (1876) e hoje universalmente conhecido debaixo da denominação de *Wuchereria bancrofti*.

---

* Baseada em dados fornecidos pelo biografado.

Endereço para correspondência: Rua General Rondon, 17 - Santos, SP.

FALCÃO, E.C. Breve notícia sobre a vida científica de Afrânio do Amaral. *Mem. Inst. Butantan, 39*: 3-9, 1975.

Cinquenta anos depois do achado inicial de Wucherer, colava grau de Doutor em Medicina pela Faculdade da Bahia, em Dezembro de 1916, um jovem nascido em Belém do Pará, cujo pendor para a pesquisa científica cedo se revelara capturando répteis para o Museu Goeldi.

Vindo para a Cidade de Salvador, alí bacharelou-se com distinção em Ciências e Letras no Ginásio da Bahia e, promovido automaticamente ao estágio superior, ingressou na Faculdade de Medicina do Terreiro de Jesus, a única que, no Norte do Brasil, possuia tradição científica e onde, logo no primeiro trimestre de 1911, serviu de monitor voluntário ao grande Mestre da Parasitologia e da Medicina Tropical, que foi M. Pirajá da Silva. Afrânio do Amaral era o seu nome.

Concluindo o curso médico com distinção em todas as Cadeiras, Afrânio dedica-se profundamente ao estudo da doença produzida pelo nematóide descoberto por Wucherer, tomando-a como tema para obter a láurea doutoral e faz jus a três prêmios: 1.º) Colocação de seu retrato no Pantheon da Escola; 2.º) Viagem ao estrangeiro para aperfeiçoamento; 3.º) Medalha Alfredo Brito pela originalidade da tese de doutoramento ("Bancroftose", 236 p.).

Deixando os bancos acadêmicos, partiu então em direção ao Sul, para enfrentar a vida profissional em São Paulo. Pondo de lado a especialização que praticara quando estudante, a alta cirurgia, realizada sob a orientação do Prof. Antonio Borja, ingressou Afrânio num campo totalmente diverso, para o qual já revelava forte pendor, ao escolher o assunto da tese para o doutorado: os trabalhos de laboratório.

Assim, a partir de Março de 1917, passou a frequentar, no Instituto Butantan, os serviços de João Florêncio Gomes, Assistente encarregado de Ofiologia e Parasitologia, além de Microbiologia.

Cinco meses mais tarde, precisamente em Agosto, foi contratado para o cargo de Auxiliar-Médico da referida instituição, instalando então o serviço de Fisiologia Operatória em relação com a Endocrinologia e a Opoterapia. Dedicando-se com afinco a esse mister, já em Outubro de 1918, teve ensejo de ser um dos três representantes do Butantan enviados à 2.ª Conferência Sul-Americana de Higiene, Microbiologia e Patologia, reunida naquela data no Rio de Janeiro e dispersada pela pandemia gripal, no auge de sua incidência na então capital do Brasil. A esse certame apresentou original contribuição sob a epígrafe "Tratamento das úlceras atômicas e fagedênicas pelo soro seco", ilustrada com peças de cera demonstrativas. Baseado nessa contribuição e em monografia de revisão da filariose, concorreu ao posto de Sub-assistente do Instituto, de cujas "Memórias" então criadas (juntamente com os "Anexos" de Ofiologia), passou a ser o editor.

Nessa altura (1918), o Butantan veio a sofrer a primeira de suas grandes crises. Desaviera-se o seu Director Geral, Vital Brazil, com o Governo do Estado, em virtude da manifesta oposição do Secretário do Interior da Presidência Altino Arantes, Dr. Oscar Rodrigues Alves, à criação da Universidade Livre de São Paulo, da qual fazia parte como professor aquele eminente cientista, que, em acentuada divergência com o Director do Serviço Sanitário de então, Arthur Neiva, acabou por aposentar-se, no decorrer de 1919, tão logo completou o necessário tempo de serviço. Ao fazê-lo, arrastou consigo todo o pessoal técnico superior do Butantan, levando-o para o Estado do Rio, onde

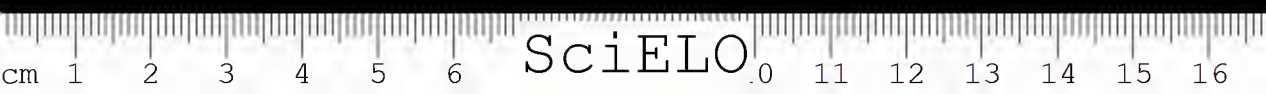
veio a fundar uma instituição privada da mesma natureza, a qual recebeu o seu próprio nome (Instituto Vital Brazil). Apenas não quiseram acompanhá-lo, apesar de convidados, João Florêncio Gomes e Afrânio do Amaral, o primeiro naturalmente indicado para suceder a Vital Brazil. Não quis o destino que tal acontecesse. Em Janeiro de 1919, poucos meses antes da retirada de Vital Brazil, João Florêncio adoece de infecção gripal e vem a falecer, mais tarde, de suas complicações. Afrânio do Amaral é, então, promovido a Assistente e a Encarregado da Seção de Ofiologia. Com a saída do antigo Director, o Butantan não só fica acéfalo, mas sobretudo desfalcado da totalidade dos seus colaboradores científicos (Dorival de Camargo Penteado, Otávio Veiga, Crissiuma de Toledo, Arlindo de Assis, Costa Pereira, Nova Gomes e Paulo Araújo). Apenas Afrânio permanece na estacada. Passa a despachar o expediente da repartição em cooperação com Arthur Neiva e assume a responsabilidade de todas as seções técnicas, não deixando perecer a obra magnífica de tantos anos, orgulho da terra bandeirante; procura e consegue cumprir a promessa que fizera ao governo paulista, de que "o Butantan não fecharia", aludindo, assim ao derrotista vaticínio que corria a respeito do desfecho da série crise funcional que dificultara a vida da tradicional instituição. São convidados, sucessivamente, para dirigir Butantan, grandes técnicos de Manguinhos, entre outros Henrique de Beaurepaire Aragão e Henrique da Rocha Lima. Apresentaram eles condições tais, que não puderam ser aceitas. Aliviam as tarefas de Afrânio, encarregando-se o Director do Instituto Bacteriológico, Ulhôa Cintra, de despachar o expediente de Butantan. Procura Amaral, sobretudo, formar novos técnicos, em substituição aos que se ausentaram. É nessa época que, mediante indicação do Serviço Sanitário, passam a trabalhar para a instituição em apreço, J. Lemos Monteiro, J. Pires Fleury, J. Bernardino Arantes, J. Rocha Botelho e J. Maria Gomes.

Após a mudança do Governo Estadual, em Maio de 1920, Alarico Silveira, Secretário do Interior da Presidência Washington Luís, convida Afrânio e o nomeia Director em comissão do Butantan, cargo em que ele permanece até fins de 1921, quando, por ter de ausentar-se do país em gozo do prêmio de viagem ao estrangeiro ganho na Faculdade de Medicina da Bahia, afasta-se por largo tempo do estabelecimento que sua energia e capacidade não deixaram soçobrar.

Reorganizado assim o Instituto Butantan, pôde Afrânio do Amaral partir para o Exterior, a fim de aprofundar e actualizar os seus conhecimentos, aproveitando a oportunidade que se lhe apresentava. Recebeu então da velha Faculdade o encargo de cumprir o seguinte temário de estudos, conducentes aos relatórios que deveria enviar à medida que fosse executando a sua missão:

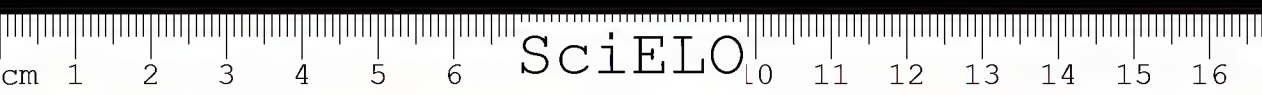
a) Ensino da Medicina Experimental na Europa e na América do Norte;
b) aspectos práticos do problema das avitaminoses;
c) soro-reações usadas no diagnóstico diferencial da sífilis;
d) orientação do Sistema Universitário na Europa e na América do Norte.

Ao termo de seus estudos e observações nos principais centros universitários europeus (Itália, França, Ibéria, Áustria, Alemanha, Países Baixos, Inglaterra e Escócia), seguiu para os Estados Unidos onde iria permanecer por mais 2 anos, aproveitando a bolsa ("fellowship") que lhe oferecera o Conselho Internacional de Saúde (C.I.S.). Nos Estados Unidos, primeiro esta-

giou na Universidade Johns Hopkins, onde o Prof. Elmer V. McCollum o orientou nas pesquisas sobre vitaminas e nutrição.

Em seguida, ao receber convite da Universidade Harvard, dali prosseguiu para Boston e Cambridge, a fim de cursar as Faculdades de Filosofia, de Medicina e de Higiene e Medicina Tropical, estagiando ainda no Mass. Institute of Technology (que então mantinha convênio com Harvard), onde, a par das actividades de Engenharia Sanitária, observaria as técnicas de concentração e de dessecação (inclusivamente do café, de cuja química se enfronhou). Na Harvard, estudou Fisiologia Animal e Experimental e Herpetologia, além de Farmacologia, bem como as reacções sorológicas da sífilis, acompanhando ainda o desenvolvimento de pesquisas que, servindo de base à Medicina e à Higiene, iriam auxiliá-lo, mais tarde, no progresso de sua carreira no Brasil, conforme se deduz de seu trabalho *in* Mem. Inst. Butantan, 1966. *33* (1). Ao cabo desses estudos, apresentou sua tese de doutoramento em Saude Pública e Medicina Tropical, intitulada "A General Consideration of Snake Poisoning", que recebeu distinção com menção especial por parte de toda a Comissão Examinadora. Esse trabalho foi julgado como "the most concise and satisfactory general statement on the principal points of interest concerning snake poisoning that has yet appeared", pelo que passou a ser impresso pela própria Harvard University Press (incl. todos os clichês para as gravuras em tricromia, preparados pela Oxford University Press), tendo aparecido no vol. II da série "Contributions from the Harvard Institute for Tropical Biology and Medicine".

Essa obra despertou a atenção das autoridades americanas para o agravamento do problema do ofidismo levando-as, depois de Afrânio ter sido convidado a ensinar na Harvard, a requisitá-lo, por intermédio do Itamarati (Ministério do Exterior) junto ao Governo de São Paulo, para que pudesse organizar e dirigir os serviços de pesquisa e defesa anti-ofídica nas Américas do Norte e Central. Nesse meio tempo, antes de regressar ao Brasil para apresentar à Faculdade da Bahia o relatório final de sua missão, Afrânio conseguiu ainda que o C.I.S. lhe facilitasse estágio e visitas a grandes instituições de pesquisa, sobretudo em Nova York (Banzhaf), Philadelphia (Kolmer), Toronto (laboratórios de pesquisa e estandardização da insulina, dirigidos por Banting e Best), Minnesotta (metabolismo, nutrição, bócio: Clínica Mayo, E.C. Kendall); Indianapolis (produção de insulina: Laboratórios Eli-Lilly).

Graças à ampla experiência assim adquirida, pôde, de volta ao Brasil, aqui introduzir e divulgar as técnicas de desidratação e liofilização de substâncias orgânicas, de redução de matérias minerais, e estandardização biológica, além de contribuir com capítulos especiais para vários tratados americanos de Medicina Interna, Medicina Tropical, Imunoterapia e Terapêutica. Outrossim, coube-lhe estimular e divulgar em nosso meio a aproveitabilidade da soja na alimentação humana, como fonte inigualável de proteinas (ricas de amino-ácidos) nutritivas. Tudo isto no terreno da Tecnologia. No dominio da organização cultural e científica, participou da introdução do Sistema Universitário em nosso meio e da fundação da Escola Paulista de Medicina, cuja cadeira de Higiene lhe foi reservada. Ao retomar seu cargo vitalício na direcção técnica do Butantan, transformou o Instituto, nele fundando o primeiro Centro de Medicina Experimental dedicado à Patologia Humana a existir na América Latina, dotando-o de vários departamentos pioneiros, destinados a pesquisas em Química Orgânica, Bioquímica, Físico-Química, Farmacologia, Fisiopatologia (Endocrinologia), Histopa-

tologia, Botânica Médica e Farmacognosia, Embriologia e Genética, todos providos de facilidades bibliográficas, instalações adequadas e biotérios bem organizados.

Desse modo, conseguiu que as "Memórias do Instituto Butantan" passassem a ser publicadas regularmente e, ainda, servir de veículo para permuta com revistas científicas numerosas e bem selecionadas. Possibilitou, ao demais, o aumento da produção de imunobiológicos, parte para distribuição oficial e parte para venda aos interessados, assim conseguindo saldos financeiros que, mediante depósito no Banco do Estado, vieram reduzir o estrangulamento que a burocracia fazendária impunha às actividades de pesquisa.

ACTIVIDADES DO ESPECIALISTA

No período de pesquisa e divulgação, organização e tecnologia e ensino universitário - no Brasil e nos Estados Unidos da América -, Afrânio do Amaral aprofundou-se em Ofiologia (ofídios, venenos e ofidismo), passando, a partir de 1935, a trabalhar igualmente em Saurologia, estudando os nossos lacertílios.

Sintetizou as suas pesquisas, catalogando todas as espécies e publicando com base sistemática 2 Listas Remissivas de Ofídios do Brasil (2 edições) e 1 Lista Remissiva dos Lacertílios do Brasil (1 edição).

À luz da 2.ª edição da Lista Remissiva dos Ofídios do Brasil, continuou a preparar, em português e em inglês, 4 volumes com gravuras coloridas das principais serpentes que ocorrem em nosso território. Essa síntese ilustrada consta da monografia "Iconografia Colorida das Serpentes do Brasil" (*Colour iconograph of the Brazilian Snakes*), cuja publicação está em vias de ser efetuada com o Instituto Nacional do Livro.

O sobre-humano esforço que fez no dito período (em que por duas vezes teve de reorganizar, modernizar e ampliar o Instituto Butantan; e depois, organizar e dirigir, nos Estados Unidos da América e na América Central, o *Antivenin Institute of America*) não lhe arrefeceu o entusiasmo pela pesquisa, conforme se vê pela seguinte estatística de sua produção original:

Em *Ofiologia*: das 245 espécies reconhecidas até então (distribuidas por 7 famílias, 6 sub-famílias, 71 gêneros) são de sua autoria 1 sub-família, 8 gêneros, 21 espécies e 35 subespécies.

Em *Saurologia*: das 131 espécies que reconheceu em 1935 (distribuídas por 4 famílias e sub-famílias e 59 gêneros), são de sua autoria 7 gêneros e 31 espécies e subespécies.

BIBLIOGRAFIA CIENTÍFICA

Em sua extensa bibliografia se arrolam actualmente 453 trabalhos, dos quais 207 versam sobre Ofídios e Ofidismo, Venenos e Animais Veneníferos.

Veterano investigador, é tido como o mais activo e conhecido especialista na América Latina, onde tem orientado pesquisadores de pelo menos duas gerações; por isso, costuma ser consultado sobre assuntos técnicos e questões ta-

xonômicas e nomenclaturais, sobre que tem exarado centenas de pareceres científicos ou tecnológicos.

Afastado do Butantan durante 15 anos, soube Afrânio do Amaral tirar proveito de suas viagens de estudo no Exterior, para ultimar pesquisas e consignar em livros as suas conclusões sobre muitos assuntos científicos, entre os quais se destacam os seguintes:

a) "Animais Veneníferos, Venenos e Antivenenos" (prefácio do Prof. Roquette Pinto). Ed. Caça e Pesca, 1945; 169 p., 63 fig..
b) "Siderurgia e Planejamento Econômico do Brasil" (Prêmio Carlos de Laet" da Academia Brasileira de Letras). Ed. Brasiliense, 1946; 460 p., 31 fig.. (Dissertação científica sobre geogênese, siderogenia e siderotecnia com farta documentação favorável à introdução da redução directa da hematita com vistas à produção do "esponja". Com carácter pioneiro, as previsões desse trabalho cada dia mais se confirmam ante a escassez mundial de sucata, pois o esponja lhe toma o lugar com vantagem e passa a abastecer os fornos elétricos na produção até dos aços de qualidade).
c) *Siphilis* — moléstia e têrmo através da História" (Prêmio Arnaldo Vieira de Carvalho" da Sociedade Paulista de História da Medicina). Ed. Instituto Nacional do Livro, 1966; 309 p., 7 fig.. (Vista de conjunto do problema mundial das treponematoses, na qual se desvenda o mito da origem americana da *lues* venérea; liga em angenericidade muitas entidades mórbidas conhecidas como *bejel, irkintja, njovera, dichchwa, yacos-pian-bouba, pinta, sibbens, lues endêmica* ou *mal judio* ou *mal dos Marranos* e tantas outras; divulga, em nosso meio, as vantagens que, para o diagnóstico da sífile trouxe a reação de Nelson & Mayer — com ulteriores aperfeiçoamentos, usando os próprios treponemas, obtidos de cultura, como antígeno específico ("TPIA test").

CARREIRA

No Instituto Butantan escalou uma por uma todas as posições científicas, desde Auxiliar e Sub-Assistente de laboratório, até Director-Científico comissionado e, depois, efectivo, em cujo cargo se aposentou ao completar 50 anos de serviço público (prestado no Brasil e no Exterior) e recebendo o prêmio previsto em lei. Sua brilhante carreira foi coroada pelo já citado convite que lhe formulou o Governo Norte-Americano, por indicação da Universidade de Harvard e do Departamento de Saúde do Exército dos Estados Unidos da América, para voltar aos Estados Unidos e organizar o *Antivenin Institute of America* (de cujo *Bulletin* foi também criador e 1.º editor), que dispunha de 3 Museus e Estações, 1 Laboratório Central de Produção e Pesquisa e 6 Regionais, além de 7 Serpentários, espalhados desde o Sul e Nordeste dos Estados Unidos até a América Central e Panamá.

VIDA INTERNACIONAL

Do exercício dessas árduas actividades resultou sua eleição (por 2 Congressos Internacionais de Zoologia) para os cargos de Membro e Director (até a Presidência e o Conselho da Comissão Internacional de Nomenclatura Zooló-

gica sediada em Londres, no Museu Britânico de História Natural) e também sua nomeação para Consultor da Organização Mundial da Saúde, em Genebra, a fim de tratar de questões relativas à produção e aferição de antivenenos e outras substânciais terapêuticas (Departamento de Produtos Terapêuticos).

SOROTERAPIA ANTI-OFÍDICA

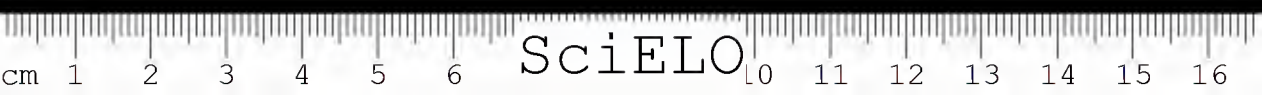
No capítulo relativo ao uso de antivenenos, Afrânio do Amaral defendeu (nos Estados Unidos da América e no Brasil) a necessidade de serem atendidas as seguintes noções novas:

1.º) A dose do específico deve ser inversamente proporcional ao tamanho (peso) da vítima: criança e cachorro devem tomar dose maior que pessoa adulta ou cavalo. Esta noção não fora prevista por nenhum antecessor na Europa ou na América.

2.º) Para os venenos necrosantes (proteolíticos), o antiveneno pode ser também dado por inoculação local em torno do ponto atingido, convindo em casos mais graves inocular ênzimo permeabilizante (hialuronídase) dos tecidos afectados.

3.º) Para conservar a potência do antiveneno, o ideal é mantê-lo no frigo. Para uso no *hinterland*, Afrânio do Amaral começou a usar nos Estados Unidos o processo de liofilização (evaporação em vácuo, a baixa temperatura). Antes da aplicação, o pó do antiveneno deve ser sulubilizado conforme hoje se adopta para outras substâncias facilmente deterioráveis quando mantidas como solutos.

4.º) Para actualizar racionalmente a aferição das actividades de venenos e antivenenos, introduziu as recomendações feitas através da Organização Mundial da Saúde e constante dos Aperfeiçoamentos científicos e precauções tecnológicas que descreveu no artigo publicado *in* OMS-RS 373/1956. Finalmente, em novo artigo publicado *in* OMS-RS 373/1956, sugeriu, à luz de pacientes pesquisas ecológicas e toxicológicas que realizou em duas "populações" vizinhas, morfológicamente indistinguíveis, do tanatofídio Jararaca (*Bothrops jararaca*) — a existência de "raças biológicas" (bioquímicas), reconhecíveis pela composição e toxicidade dos respectivos venenos.

Mem. Inst. Butantan
39: 11-25, 1975

AFRÂNIO DO AMARAL
BIBLIOGRAFIA DE SEUS TRABALHOS.

1. PESQUISAS ORIGINAIS PUBLICADAS EM REVISTAS CIENTÍFICAS

1. 1 1915 Contribuição ao estudo da leishmaniose cutâneo-mucosa pelas injeções endoflébicas de emético. *Arq. bras. Med.*, *5*: 145.

1. 2 1918 A filariose de Bancroft (revisão). *Mem. Inst. Butantan, 1* (2): 89.

1. 3 1918 Do emprego do soro normal sêco no tratamento das úlceras atônicas e fagedênicas. *Mem. Inst. Butantan, 1*(2): 209.

1. 4 1921 Contribuição para o conhecimento dos ofidios do Brasil. *Anexos das Mem. Inst. Butantan,* Secção Ofiologia, *1*(1).

1. 5 1921 Processos biológicos usados na profilaxia da peste bovina. *Bol. Soc. med. cir. S. Paulo, 4*(3): 39.

1. 6 1921 Notas de soroterapia. *Bol. Soc. med. cir. S. Paulo, 4*(5/6): 109.

1. 7 1921 Últimos trabalhos inéditos de J.F. Gomes (Duas novas espécies de Colubridos Opistóglifos brasileiros). *An. Paul. Med. Cir.*, *9* (7/8): 1.

1. 8 1921 Um novo soro anti-peçonhento (soro anti-crotálico norte-americano). *Bol. Soc. med. cir. S. Paulo, 4* (5/6): 134.

1. 9 1923 The Brazilian contribution towards the improvement of the specific snake bite treatment. *Proc. N. York pathol. Soc.*, *23* (1/5): 89.

1.10 1923 New genera and species of snakes. *Proc. N. Engl. Zool. Cl.*, *8*: 85.

1.11 1924 Eight short papers on snakes and their biology. *Copeia,* (126): 17.

1.12	1924	New genus and species of South American snakes contained in the United States National Museum. *J. Wash. Acad. Sc., 14*(9): 200.
1.13	1924	*Helminthophis* (Studies of Neotropical Snakes. I). *Proc. N. Engl. Zool. Cl., 9*: 25.
1.14	1924	Notes on some Central American snakes. *Occ. P. Boston Soc. Nat. Hist., 5*: 129.
1.15	1924	Hyperovarianism and its specific treatment. *Endocrinology, 8* (5): 652.
1.16	1924	On the biological diferentiation of Neotropical species of snakes Pit-Vipers. *Am. J. trop. Med., 4* (5): 447.
1.17	1925	South American snakes in the collection of the United States National Museum. *Proc. U.S. Nat. Mus., 67*.
1.18	1925	On the oviparity of *Lachesis muta* Daudin, 1803. *Copeia, 149*: 93.
1.19	1925	Ofídios de Mato Grosso. Com. (Rondon) L. T. E., Mato Grosso ao Amazonas. Publ. *84*, 43 p.
1.20	1926	Ophidia from South America in the Carnegie Museum: a critique to Dr. L. E. Griffin's, "Catalogue of the Ophidia from South America at present (June 1916) contained in the Carnegie Museum". *Ann. Carneg. Mus., 16* (2): 319.
1.21	1926	Notas de Ofiologia. *Rev. Mus. Paulista, 14.* a) Sobre o emprego do nome genérico *Micrurus* em vez de *Elaps,* p. 3. b) Sobre o emprego do nome genérico *Sibynomorphus* em vez de *Leptognathus, Cochliophagus,* etc., p. 7. c) Sobre a preferência do nome genérico *Pseudoboa* Schneider, 1801 a *Clelia* Fitzinger, 1826 e *Oxyrhopus* Wagler, 1830, e do nome específico *Pseudoboa petola* (L., 1758) a *P. petolaria* (L., 1758), p. 10. d) Sobre a invalidez de um gênero e algumas espécies de ofídios sul-americanos, p. 17. e) Sobre a diferenciação dos nomes genéricos *Lachesis, Trimeresurus* e *Bothrops,* p. 34.
1.22	1926	Novos gêneros e espécies de ofídios brasileiros. *Arq. Mus. Nac. Rio de Janeiro, 26*: 95.
1.23	1926	Nomes vulgares de ofídios do Brasil. *Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro, 2* (2): 19.

1.24 — 1926 — Série de trabalhos publicados *in*: Coletânea Ofiológica (14), *Rev. Mus. Paulista, 15*: 1-110.

a) Albinismo em "cobra coral".

b) Três subespécies novas de *Micrurus corallinus* (Wied): *M. corallinus corallinus, M. corallinus riesei* e *M. corallinus dumerilii.*

c) Da invalidez da espécie de *Colubrideo Elapineo Micrurus ibiboboca* (Merren) e redescrição de *M. lemniscatus* (L.).

d) Sobre a *Lachesis muta* (L.), espécie ovipara.

e) Da invalidez da espécie de *Colubrideo Dipsadineo Sibynomorphus peruanus* (Boettger).

f) Albinismo em Dorme-Dorme.

g) Da ocorrência de albinismo em cascavel.

h) Ofídios sul-americanos do Museu Carnegie e espécies novas de Griffin.

i) Sobre o nome genérico dos ofídios *Liophis* (Wagler, 1839) vs. *Leimadophis* (Fitzinger, 1843).

j) Da invalidez do nome genérico de ofídios *Erpetodryas* ou *Herpetrodyas.*

k) Da pholidose dorsal da espécie de *Colubridae, Philodryas aestivus.*

l) Variações das marcas dorsais de *Crotalus terrificus* Laurenti, 1768.

m) Bicefalia em ofídios.

n) Estudo comparativo da evolução ontogenética de *Pseudoboa cloelia* (Daudin) e *Pseudoboa haasi* (Boettger).

1.25 — 1926 — On *Micrurus mipartitus* and allied forms (Studies of Neotropical Ophidia. II). *Proc. N. Engl. Zool. Cl., 9*: 61.

1.26 — 1926 — On *Helminthophis flavoterminatus* (Studies of Neotropical Ophidia. III). *Proc. Biol. Soc. Washington, 39*: 123.

1.27 — 1926 — A new North American Snake. *Proc. N. Engl. Zool. Cl., 9*: 79.

1.28 — 1926 — The snake bite problem in the United States and in Central America. *Report Med. Dept. United Fruti Co. Ann. Rept., 15*: 229 e *Bull. Antivenin Inst. Am., 1*: 31, 1927.

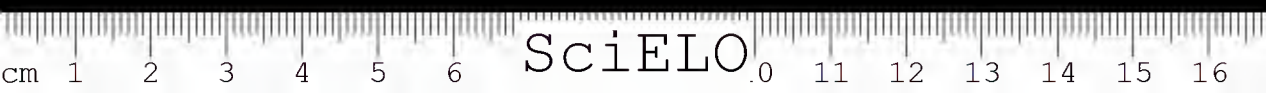
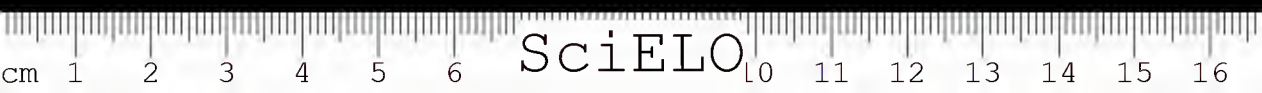
1.29 — 1927 — Antivenin specificity. *J. Bacteriol., 13* (1): 48.

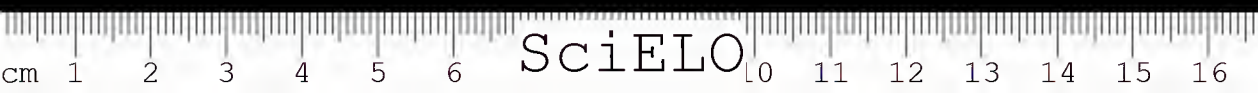
1.30 — 1927 — A new form of *Crotalidae* from Bolivia (Studies of Neotropical Ophidia. IV.). *Bull. Antivenin Inst. Am.,* 1(1): 5.

1.31	1927	Notes on *Bothrops lansbergii* and *B. brachys* (Studies of Neotropical Ophidia. V.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (1): 22.
1.32	1927	Studies of African Ophidia. *Bull. Antivenin Inst. Am.*, 1 (1): 25.
1.33	1927	A new genus of snakes from Honduras (Studies of Neotropical Ophidia. VI.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (1): 28.
1.34	1927	The new Antivenin Institute. *Harvard Alumni Bull.*, Febr.: 601.
1.35	1927	Snake poisoning and its treatment. *Trans. Coll. Physns. Philad., 49*: 65.
1.36	1927	The snake bite problem in the United State and in Central America. *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (2): 31.
1.37	1927	An interesting collection of snakes from West Colombia (Studies of Neotropical Ophidia. VII.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (2): 44.
1.38	1927	*Crotalus goldmani* Schmidt, 1922, a synonym of *C. mitchellii* Cope, 1861 (Studies of Neartic Ophidia. I.). *Bull Antivenin Inst. Am., 1* (2): 47.
1.39	1927	*Crotalus pricei* V. Denburgh, 1896, a synonym of *C. triseriatus* (Wagler, 1830) (Studies of Neartic Ophidia. II.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (2): 48.
1.40	1927	The anti-snake bite campaign in Texas and in the sub-tropical United States. *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (3): 37.
1.41	1927	Notes on neartic poisonous snakes and the treatment of their bites. *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (3): 61.
1.42	1927	*Trachyboa* Peters, 1860 (Studies of Neotropical Ophidia. VIII.). *Bull Antivenin Inst. Am., 1* (3): 86.
1.43	1927	*Anomalepis* Jan 1861 (Studies of Neotropical Ophidia. IX.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (3): 88.
1.44	1927	A new *Elapid* from Western Panama. *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (4): 100.
1.45	1927	The anti-snake bite campaign in the United States. *Brazil, 1* (1): 13.
1.46	1928	Improved process of venom extraction. *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (4): 100.

1.47	1928	Amounts of venom secreted by Neartic Pit-Vipers (Studies of snakes venom. I.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 1* (4): 103.
1.48	1928	Further notes on an interesting collection of snakes from W. Colombia (Studies of Neotropical Ophidia. X.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 2* (1): 6.
1.49	1928	Snakes from the Santa Marta region, Colombia (Studies of Neotropical Ophidia. XI.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 2* (1): 7.
1.50	1928	The fine art of snake culture. *Independent,* (April); 403.
1.51	1928	Specific antivenins to combat scorpionism and arachnidism. *Bull Antivenin Inst. Am., 2* (3): 69.
1.52	1928	On *Crotalus confluentus* Say, 1823 and its allied forms. *Bull. Antivenin Inst. Am., 2* (4): 86.
1.53	1929	Notes on *Crotalus tigris* Kennicott, 1859. *Bull Antivenin Inst. Am., 2* (4): 82.
1.54	1929	On *Crotalus tortugensis* V. & S., 1921, *C. atrox elegans* Sch., 1922 and *C. a. lucasensis* (V., 1920). *Bull. Antivenin Inst. Am., 2* (4): 85.
1.55	1929	Filogenia das cascavéis. *An. Soc. Cient. Argent., 107*: 369.
1.56	1929	Phylogeny of the rattlesnakes. *Bull. Antivenin Inst. Am., 3* (1): 6.
1.57	1929	Key to the rattlesnakes of the genus *Crotalus* Linné, 1758. *Bull. Antivenin Inst. Am., 3* (1): 4.
1.58	1929	On the *Bothrops lansbergii* group (Neotrop. Ophidia. 12). *Bull. Antivenin Inst. Am., 3* (1): 19.
1.59	1929	A new colubrine snakes in the Vienna Museum (Neotropical Ophidia. 13). *Bull. Antivenin Inst. Am., 3* (2): 40.
1.60	1929	Da classificação e conceito de espécie em ofiologia. *Bol. Agric., 30* (7/8): 538.
1.61	1929	Campanhas anti-ofídicas. *An. Congr. Bras. Hig.,* 5.º. Recife, p. 145.
1.62	1929	Notas à margem da sciencia. *Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro, 5* (4): 105.
1.63	1929	Ofídios da região neotrópica. Nota sobre as espécies mais importantes do ponto de vista médico e higiênico. *An. IV Conf. S.A. Hig. Microb. Pat.,* Rio de Janeiro, *1*: 55.

1.64	1929	Ofídios do Brasil. *An. IV Conf. Sul Am. Hig. Microb. Pat.*, Rio de Janeiro, *1*: 25.
1.65	1929	Estudos sobre ofídios neotrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 4*. a) Valor sistemático de várias formas de ofídios neotrópicos. b) Lista remissiva dos ofídios neotrópicos. c) Lista remissiva de ofídios do Brasil. d) Revisão do gênero *Spilotes*. e) Revisão do gênero *Phynomax*. f) Revisão do gênero *Drymarchon*. g) Revisão da espécie *C. dichrous* (*Drymoluber*).
1.66	1930	Uma raridade ofídica do Brasil. *Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro, 6* (1): 1.
1.67	1930	Notes on *Spilotes pullatus*. *Bull. Antivenin Inst. Am., 3* (4): 98.
1.68	1930	Princípios e planos de campanha anti-ofídica. *Rev. Hig. Saúde Publ., 4*: 225.
1.69	1930	Notes on two colubrine snakes (Studies of Neotropical Ophidia. XIV.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 4* (1): 12.
1.70	1930	A rare brazilian snake (Studies of Neotropical Ophidia. XV.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 4* (1): 13.
1.71	1930	Two new snakes from Central Colombia (Studies of Neotropical Ophidia. XVI.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 4* (2): 27.
1.72	1930	A new brazilian snake (*Atractus serranus*) (Studies of Neotropical Ophidia. XXIV.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 4* (3): 65.
1.73	1930	A new race of *Bothrops neuwiedii* (Studies of Neotropical Ophidia. XXV.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 4* (3): 65.
1.74	1930	Sobre a caracterização das espécies em Ofiologia. *Rev. Agric.* (S. Paulo), *5* (11/12): 488.
1.75	1930	Regras internacionais de nomenclatura zoológica (ed. portuguêsa). *Mem. Inst. Butantan, 5*: 233.
1.76	1930	Campanhas anti-ofídicas. *Mem. Inst. Butantan, 5*: 193.
1.77	1931	Additional notes on Colombian snakes (Studies of Neotropical Ophidia. XXIII.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 4* (4): 85.

1.78	1931	Ophidia of Colombia, Check-list (Studies of Neotropical Ophidia. XXVI.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 4* (4): 89.
1.79	1931	O sôro sêco como cicatrizante das úlceras produzidas pelo veneno botrópico. *Bol. Soc. med. cir. S. Paulo, 15* (10): 382. *Mem. Inst. Butantan, 6*: 251.
1.80	1931	Modernas aquisições no terreno da terapêutica pelos agentes biológicos. *Bol. Soc. med. cir. S. Paulo, 15* (10): 398.
1.81	1931	Estudo atual da terapêutica biológica. *Bras. méd., 45* (43): 994.
1.82	1931	Maximiliano, Príncipe de Wied. *Bol. Mus. Nac. Rio de Janeiro, 7*: 187.
1.83	1931	Comentários a propósito de alguns boidos (English translation). Remark on some Boid snakes. Studies of Neotropical Ophidia. XXVIII.). *Mem. Inst. Butantan, 6*: 173.
1.84	1932	Pontos de vista básicos na terapêutica do ofidismo. *Mem. Inst. Butantan, 6*: 241.
1.85	1932	On two small collections of snakes from Central Colombia (Studies of Neotropical Ophidia. XXVII.). *Bull. Antivenin Inst. Am., 5* (3): 66.
1.86	1932	Notas sobre cromatismo de ofídios, I. Primeiro caso de eritrismo em serpente, observado no Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 7*: 75.
1.87	1932	Notas sobre cromatismo de ofídios, II. Casos de variação de colorido de certas serpentes. *Mem. Inst. Butantan, 7*: 81.
1.88	1932	Aequalia cum aequalibus. *Resen. clin. cient., 1* (5): 147.
1.89	1932	Aequalia cum aequalibus (Italiano). *Rass. clin. scient., 10* (5): 3.
1.90	1932	Novos gêneros e espécies de lagartos do Brasil (Estudos sobre Lacertílios Neotrópicos. I). *Mem. Inst. Butantan, 7*: 51.
1.91	1932	Novas notas sobre espécies colombianas (Estudos sobre Ofidios Neotrópicos. XXIX.). *Mem. Inst. Butantan, 7*: 103.
1.92	1932	Notas sobre ofidismo no Brasil. *Alm. Agric. bras., 12*.
1.93	1932	Hemaglutininas naturais no sangue de serpentes e de outros animais pecilotérmicos. *Mem. Inst. Butantan, 7*: 179.

1.94	1932	Ueber die natuerlichen Haemagglutinine der Schlangen und anderer Kaltblutehier. *Z. Immunforsch., 77* (3/4): 315.
1.95	1932	Ensaio de classificação das rickettsioses à luz de nossos atuais conhecimentos. *Mem. Inst. Butantan, 7*: 343.
1.96	1932	Hábitos curiosos da espécie *Tachymenis brasiliensis* Gomes (*Colubridae, Boiginae*). *Mem. Inst. Butantan, 7*: 89.
1.97	1932	Sobre um caso de necrofilia heteróloga na jararaca (*B. jararaca*). *Mem. Inst. Butantan, 7*: 93.
1.98	1932	Uma nova raça de *Bothrops neuwiedii*. *Mem. Inst. Butantan, 7*: 95.
1.99	1932	Uma nova espécie de Colubrideo opistóglifo, do gênero *Chlorosoma* Wagler, 1930. *Mem. Inst. Butantan, 7*: 99.
1.100	1933	Histoire naturelle et classification des Rickettsioses. Position systématique du typhus exantématique de S. Paulo. *Rev. sud-am. Méd. Chir., 4* (11): 781.
1.101	1933	Toxemia gravídica e seu tratamento racional. *Bol. Soc. med. cir. São Paulo, 17*: 44.
1.102	1933	La toxémie gravidique et son traitment rationnel. *Rev. sud-am. Méd. Chir., 4* (5): 345.
1.103	1933	Alimentação das serpentes do Brasil. *Bol. biol., 1* (1): 2.
1.104	1933	Significação do aparelho venenífero nos ofídios. *Bahia Rural, 1* (2): out.º.
1.105	1933	Serpentes venenosas e não venenosas. *Bahia Rural, 1* (3): nov.º.
1.106	1933	Principais serpentes venenosas da Bahia. *Bahia Rural, 1* (4): dez.º
1.107	1934	Sobre a duração da atividade das antitoxinas e antivenenos. *Mem. Inst. Butantan, 7*: 321. et *Bras. med., 48* (27): 525.
1.108	1934	De la durée de l'action des antitoxines et des antivenins. *Rev. sud-am. Méd. Chir., 5*: 209.
1.109	1934	Estatísticas sobre ofidismo. *Bahia Rural, 1* (8): 157.
1.110	1934	Envenenamento ofídico. Preparo dos antivenenos. *Bahia Rural, 1* (7): 107.

1.111	1934	Envenenamento ofídico. Prevenção das picadas. *Bahia Rural, 1* (6): 55.
1.112	1934	Envenenamento ofídico. Sua profilaxia. *Bahia Rural, 1* (5): 9.
1.113	1934	Regras internacionais de nomenclatura zoológica ao alcance de todos. *Bol. biol., 1* (2): 72.
1.114	1934	Hábitos da boipeva (*Xenodon merremii*). *Bol. biol.*, n.s. *2* (1): 2.
1.115	1933/34	Notas sobre cromatismo de ofídios. 3. Um caso de xantismo e um novo de albinismo observados no Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 8*: 149.
1.116	1933/34	Estudos sobre ofídios neotrópicos. 30. Novo gênero e espécie de Colúbrideo na fauna da Colombia. *Mem. Inst. Butantan, 8*: 157.
1.117	1933/34	Estudos sobre ofídios neotrópicos. 31. Sobre a espécie *Bothrops alternata* D. & B., 1854 (*Crotalidae*). Variações, redescrição. *Mem. Inst. Butantan, 8*: 161.
1.118	1933/34	Coleta herpetológica no nordeste do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 8*: 183.
1.119	1934	Noções práticas sobre picadas de serpentes, aranhas, escorpiões e centopéias. *Bol. biol.*, n.s. 2 (2): 52.
1.120	1934	Lista de animais nocivos ao homem, à lavoura e à pesca. *Bol. biol.*, n.s. *2* (2): 54.
1.121	1935	Schlangen in der Wissenschaft. *Med. Welt, 21*: 1.
1.122	1935	Estudos sobre lacertílios neotrópicos. 2. Novo gênero e espécie de lagarto do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 9*: 249.
1.123	1935	Estudos sobre lacertílios neotrópicos. 3. Um novo gênero e duas espécies novas de *Geckonidae* e uma nova raça de *Amphisbenidae*, procedentes do Brasil Central. *Mem. Inst. Butantan, 9*: 253.
1.124	1935	Coleta herpetológica no Centro do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 9*: 233.
1.125	1935	Coleta herpetológica no nordeste do Brasil (Contr. 2). *Mem. Inst. Butantan, 9*: 225.
1.126	1935	Estudos sobre ofídios neotrópicos. 32. Apontamentos sobre a fauna da Colombia. *Mem. Inst. Butantan, 9*: 209.
1.127	1935	Estudos sobre ofídios neotrópicos. 33. Novas espécies de ofídios da Colombia. *Mem. Inst. Butantan, 9*: 219.

1.128	1935	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil. 7. Novos gêneros e espécies de Colubrideos opistóglifos. *Mem. Inst. Butantan. 9*: 203.
1.129	1936	Schlangengift und Schlangift-Schutzerum. *Med.* Welt., *10*: 851.
1.130	1935/36	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil. 8. Lista remissiva dos ofídios do Brasil (2.ª edição). *Mem. Inst. Butantan, 10*: 87.
1.131	1937	Estudos sobre lacertílios neotrópicos. 4. Lista remissiva dos lacertílios do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 11*: 167.
1.132	1937	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil. 9. Nova espécie de Colubrideo opistóglifo confundível com *Philodryas serra* (Schlegel, 1837). *Mem. Inst. Butantan, 11*: 205.
1.133	1937	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil. 10. Redescrição de *Philodryas serra* (Schlegel, 1837). *Mem. Inst. Butantan, 11*: 213.
1.134	1937/38	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil. 11. Sinopse das Crotalideas do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 11*: 237 *et in* Livro Jubilar Prof. L. Travassos.
1.135	1937	Estudos sobre ofídios neotrópicos. 34. Novas notas sobre a fauna da Colombia e descrição de uma espécie nova de Colubrideo áglifo. *Mem. Inst. Butantan, 11*: 231.
1.136	1937	Regras internacionais de nomenclatura zoológica (2.ª edição). *Mem. Inst. Butantan, 11*: 241.
1.137	1937	A vacina variólica no laboratório e na prática sanitária. *Bras. med., 51* (47): 1157 e *51* (48): 1179.
1.138	1946	Nota sobre nomenclatura zoológica. *Papeis Avulsos. Depto. Zool. Sec. Agric. E. S. Paulo, 7* (14): 181.
1.139	1948	Lacertílios do Pará. *Bol. Mus. Goeldi, 10*: 107.
1.140	1948	Ofídios do Pará *Bol. Mus. Goeldi, 10*: 150.
1.141	1948	Serpentes gigantes. *Bol. Mus. Goeldi, 10*: 211.
1.142	1950	Codificação da nomenclatura zoológica. *Arq. Zool. S. Paulo, 7*: 379.
1.143	1950	Two new South American lizards. *Copeia, 10*: 281.
1.144	1953/54	Reintegração do diretor efetivo. *Mem. Inst. Butantan, 25* (2): vii-xi.
1.145	1954	Reorganização dos Serviços T.-A. do Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan, 26*: vii-x.

1.146	1954	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil (12). Notas a respeito de *Helminthophis ternetzii* Blgr. *Mem. Inst. Butantan, 26*: 191.
1.147	1954	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil (13). "Cobra-cegas" (Fam. *Typhlopidae* e Fam. *Leptotyphlopidae*). *Mem. Inst. Butantan, 26*: 197.
1.148	1954	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil (14). Duas novas espécies de "cobra-cega". *Mem. Inst. Butantan, 26*: 203.
1.149	1954	Contribuição ao conhecimento dos ofídios neotrópicos (35). A propósito da revalidação de *Coluber lanceolatus* Lacépède. *Mem. Inst. Butantan, 26*: 207.
1.150	1954	Contribuição ao conhecimento dos ofídios do Brasil (15). Situação taxonômica de algumas formas de *Crotalidae, Lachesinae,* recentemente descritas. *Mem. Inst. Butantan, 26*: 215.
1.151	1954	Contribuição ao conhecimento dos ofídios neotrópicos (36). Redescrição da espécie *Bothrops hyoprora* Amaral, 1935. *Mem. Inst. Butantan, 26*: 221.
1.152	1954	Contribuição ao conhecimento dos ofídios neotrópicos (37). Sub-espécies de *Epicrates cenchria* (L.). *Mem. Inst. Butantan, 26*: 227.
1.153	1954	Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica. *Mem. Inst. Butantan, 25* (2): xiii. *Papéis Avulsos Depto. Zool. S.A. S. Paulo, XI* (27): 517.
1.154	1956	Notes on the principles and procedures for the international standadization of antivenins. World Health Organization (Expert Commit. Biol. Standardization). WHO/BS/364.
1.155	1956	Preliminary data for the collaborative assay of venoms. World Health Organization (Expert Commit. Biol. Standardization). WHO/BS/373.
1.156	1959	Codificação da Nomenclatura Zoológica. *Bol. Soc. Est. Filol., 2* (3): 107.
1.157	1959/60	Especificidade da composição enzímica dos venenos. *Cien. Cult., 11* (3): 176.
1.158	1960	Peçonha e veneno: seu conceito e distinção em linguística comparada. *Bol. Soc. Est. Filol., 2* (4): 151.
1.159	1960	Despoupança, neologismo indispensável em Ciência Econômica. *Bol. Soc. Est. Filol., 2* (4): 335.
1.160	1961	Prosódia de — *stylus* e *stilus* e seus compostos. *Bol. Soc. Est. Filol., 3* (5): 3.

1.161	1961	Ruy e a Medicina Preventiva (Centen. Nasc. Ruy Barbosa). *Bol. Soc. Est. Filol., 3* (5): 153.
1.162	1963	Herpetological Note: *Calamodontophis* n.n., for *Calamodon* Amaral. *Copeia, 3*: 580.
1.163	1963	Comment on the proposal to validate the name *Lystrophis* Cope. *Bull. Zool. Nomencl., 20*(2): 83.
1.164	1963	Venomous animals and zootoxicoses. Proc. XVI Intern. Congr. Zool., Washington, *1*: 95.
1.165	1964	Comment on the proposal to substitute the generic name *Dryadophis* Stuart for *Mastigodryas* Amaral. *Bull. Zool. Nomencl., 21* (1): 13.
1.166	1964	Gender of generic names in -ops. *Bull. Zool. Nomencl., 21* (3): 212.

2. CONFERÊNCIAS, COMUNICAÇÕES E TRABALHOS DE DIVULGAÇÃO

2. 1	1920	Excursão à Ilha da Queimada Grande (Notas sobre a biologia de uma *Lachesis*). Com. Soc. Med. Cir. São Paulo, 15/04. *Colet. Trab. Inst. Butantan, 2*: 49.
2. 2	1920	Anafilaxia e doença do soro. Com. Soc. Med. Cir. São Paulo, 15/04. *Colet. Trab. Inst. Butantan, 2*: 77.
2. 3	1920	Do preparo de soros antipeçonhentos. Com. Soc. Med. Cir. São Paulo, 1/06. *Colet. Trab. Inst. Butantan, 2*: 85.
2. 4	1921	Contribuições para o conhecimento da biologia dos ofídios brasileiros: Habitat, hábitos e alimentação. Com. Soc. Med. Cir. São Paulo, 1/09. *Colet. Trab. Inst. Butantan, 2*: 177.
2. 5	1921	Contribuição para o conhecimento da biologia dos ofídios brasileiros: Reprodução. Com. Soc. Med. Cir. São Paulo, 15/09. *Colet. Trab. Instituto Butantan, 2*: 185.
2. 6	1925	Vitaminas e avitaminoses. Conf. Soc. Med. Cir. São Paulo. *Bol. Soc. med. cir. S. Paulo, 7*: 18.
2. 7	1925	El metabolismo basal y las endocrinopatias. Conf. no Inst. Med. Exp. Buenos Aires.
2. 8	1926	Remarks on some Neartic and Neotropic poisonous snakes. Lect. Am. Soc. Trop. Med., Wash., May.
2. 9	1929	Conferência inaugural do V Congr. Bras. de Higiene, Recife. *Brasil Hig., 1*: 28.

2.10	1930	Serpentes venenosas sul-americanas. Com. Congr. Int. Biol., Montevideo.
2.11	1931	Campanhas anti-ofídicas no Brasil e nos Estados Unidos. Conf. realizada na Ac. Nac. Med., Rio de Janeiro, 16/07.
2.12	1934	Vitaminas e aparelhos endócrino. Conf. inaugural da Escola Paulista de Medicina, 29/09.
2.13	1959	Modern Toxinology. Conferências (2) realizadas no Inst. Infect. Dis. & Exp. Med., Tóquio, Japão.
2.14	1966	Comunicação ao Int. Symp. on Animal Venoms, Instituto Butantan, São Paulo, 17-23/07.

3. RELATÓRIOS

3.1	1923	O ensino da Fisiologia Experimental nos Estados Unidos. Prêmio de viagem da Fac. Med. Bahia, Rel. I. *In*: *Gaz. med. Bahia, 54* (7): 515.
3.2	1924	A questão das vitaminas; sua compreensão atual. Prêmio de viagem da Fac. Med. Bahia, Rel. II. *In*: *Gaz. med. Bahia, 55* (4): 147.
3.3	1925	A questão das vitaminas: sua compreensão atual. Prêmio de viagem da Fac. Med. Bahia, Rel. III. *In*: *Gaz. med. Bahia, 54* (4).

4. ESTUDOS HISTÓRICOS, BIOBIBLIOGRÁFICOS, SÓCIO-ECONÔMICOS, FILOLÓGICOS E LINGÜÍSTICOS E TRABALHOS DE DIVULGAÇÃO

Além dos publicados em livros e que constam das referências 5.17, 5.18, 5.22, 5.28 e 5.38, apresentou o homenageado uma lista de 176 notas e publicações maiores em jornais diários, que denotam a extraordinária versatilidade e atividade intelectual do autor. Nada menos de 126 trabalhos versando sobre Filologia e Lingüística (excluídos os que se relacionam à nomenclatura zoológica, inseridos no item 1 desta relação), 23 sobre histórico de instituições médico-científicas e notas biobibliográficas e 27 sobre estudos sócio-econômicos integram a lista de tais contribuições, que constituem parte relevante do acervo bibliográfico do Dr. Afrânio do Amaral e que a Comissão Editorial lamenta não poder reproduzir *in extenso*, por absoluta carência de espaço.

5. LIVROS E MONOGRAFIAS

5. 1	1916	A Bancroftose. Tese, Fac. Med. Bahia (Prêmio Alfredo Britto).
5. 2	1922	Snake Poisoning. *In*: Am. Med. Encycl. (Nelson Loose-Leaf Living Med.).

5. 3	1924	Snake venoms in relation to the snake bites. Tese (m.c.l.), Harvard Univ. School Publ. Health, Boston, Mass.
5. 4	1925	General consideration of snake poisoning and observations on Neotropical Pit-Vipers (6 papers), Contr. H. Harvard Inst. for Trop. Biol. & Medicine. Cambridge, Harvard Univ. Press. 64 p.
5. 5	1930	Animais venenosos do Brasil. São Paulo, Inst. Butantan, 65 p.
5. 6	1931	Animais venenosos do Brasil. São Paulo, Secr. Agr. Ind. Com. 65 p.
5. 7	1931	Venoms and Antivenins. *In*: Jordan, E.O. & Falk. — The newer knowledge of bacteriology and immunology. Chicago, Univ. of Chicago Press. p. 1066.
5. 8	1931	Snake venoms and antivenins. *In*: Piersol, The Cyclopedia of Medicine.
5. 9	1933	Snake poisons and their antidotes. Brennemann's Practice of Pediatrics, 1.ª ed.
5.10	1937	Snake bites. Poisonous snakes. *In*: Sajou's Cyclopedia of Medicine, 2.ª ed.
5.11	1937	Snake poisoning. *In*: Nelson's System of Medicine, 2.ª ed. p. 683.
5.12	1937	Snake poisons and their antidotes. Brennemann's Practice of Medicine, 2.ª ed.
5.13	1937	Cinco anos de reorganização do Instituto Butantan. São Paulo, Rev. Tribunais. 74 p.
5.14	1937	O progresso da Biologia. *In*: Peixoto, A. *et al.*, Aspectos da cultura americana. São Paulo, Editora Nacional.
5.15	1941	Serpentes em crise. São Paulo, Rev. Tribunais.
5.16	1945	Animais veneníferos, venenos e antivenenos. São Paulo, Ed. Caça e Pesca. 169 p.
5.17	1945	Biologia e Lingüística. São Paulo, Edigraf. 150 p.
5.18	1947	Siderurgia e planejamento econômico (Prêmio Car-de Lact). São Paulo, Ed. Brasiliense.
5.19	1951	Poisoning (venenation) by punctures of fish and other animals. *In*: Gradwohl, R.B.H. *et al.*, Clin. Trop. Medicine (St. Louis). p. 1265.
5.20	1951	Snake venenation. *In*: Gradwohl, R.B.H., Clin. Trop. Medicine (St. Louis). p. 1238.

5.21	1951	Poisoning (envenomation) by scorpions and spiders. *In*: Gradwohl, R.B.H. *et al.*, Clin. Trop. Medicine (St. Louis). p. 1224.
5.22	1951	A soja na alimentação popular (Prêmio Nacional de Alimentação). Rio de Janeiro, SAPS. 152 p.
5.23	1951	Pesquisas filológicas. São Paulo, Rev. Tribunais. 275 p.
5.24	1954	Ofiotoxicoses. *In*: Roos, Terapêutica Clínica, Havana.
5.25	1954	Os nossos Institutos Científicos (Mem. IV Cent. Fund. São Paulo). São Paulo, Graf. Municipal.
5.26	1955	Snake venom poisoning. *In*: Cecil Textbook of Medicine, New York.
5.27	1955	Atividades do Instituto Butantan em 1954 (Projeto de autarquia). São Paulo, Rev. Tribunais.
5.28	1958	Soja e alimentação. Monog. São Paulo, Sec. Agric.
5.29	1959	Snake bite. In: Conn, H.F., Current Therapy. Philadelphia, Saunders.
5.30	1959	Snake venom poisoning. *In*: Cecil & Loeb, Textbook of Medicine, New York.
5.31	1959	The newer knowledge of snake venoms and the antivenomous therapy. Symp. Haffkine Inst. (Diamond Jubilee), Bombay, *15*: 128.
5.32	1963	Snake venoms and their antidotes. *In*: Brennemann-Kelley, Practice of Pediatrics.
5.33	1965	Siphilis-Moléstia e têrmo através da História (Prêmio Arnaldo Vieira de Carvalho). Rio de Janeiro, Inst. Nac. Livro. 309 p.
5.34	1965	Iconografia colorida das serpentes do Brasil. Rio de Janeiro, Inst. Nac. Livro. 4 v.
5.35	1966	Venom and antivenin specificity: modern concept. I Int. Symp. on Animal Venoms, Inst. Butantan. *Mem. Inst. Butantan, 33* (supl.), fasc. 1: 293.
5.36	1966	Código Internacional de Nomenclatura. Rio de Janeiro, Inst. Nac. Livro.
5.37	1973	Linguagem científica. Rio de Janeiro, Inst. Nac. Livro.

Mem. Inst. Butantan
39: 27-36, 1975

COMPLEXIDADES NOMENCLATURAIS EM BIOLOGIA. GÊNERO* DE NOMES GENÉRICOS TERMINADOS EM -OPS Z. N. (S) 1572. **

AFRÂNIO DO AMARAL

RESUMO: A expressão *-ops* final de nomes genéricos em Zoologia não pode corresponder a -ὤψ(*-ŏps*), pois esta forma é um nome defectivo e seu nominativo singular apenas surgiu pela obra do médico bizantino Areteus, a qual, por definição, não pertence ao "grego antigo". Lexigenicamente, proveio da contração do substantivo ὄψις(*-ŏpsis*) e, como este, conservou breve a vogal da raiz simples; breve, que sempre foi, também admitiu a ampla faixa polissêmica (de caráter genérico em Zoologia) de: *aspecto*, *aparência*, *face*, *vista* e até *voz*. Dest'arte, a admissão de *-ŏps* em Zoologia infringe 2 dispositivos fundamentais do Código Internacional de Nomenclatura, a saber: a) art. 11 (f), que exige: "um nome de nível genérico deve ser um substantivo no nominativo singular ou como tal considerado"; b) art. 29 (a) (i), que esclarece: "quando ocorre no Código o termo "Latim" corresponde às formas antiga, medieval e moderna do latim; todavia, o termo "Grego" se refere exclusivamente ao "grego antigo". Finalmente, *ŏpsis* (ou *ŏps*) e todos os demais nomes em *-sis* sempre foram considerados femininos no grego.

UNITERMO: Nomes genéricos terminados em *-ops*.

INTRODUÇÃO

No XIV C.I.Z. (Copenhague, 1963), votei pela aprovação das "Regras Revistas" para a determinação do gênero de nomes genéricos. Nesse documento, a Regra [(b) (III)], baseada na Proposta 84, disposição 7, considera como sendo do gênero feminino todos os nomes que têm o final em *-ops* ou *-opsis*, obviamente derivado da correspondente palavra grega. Na discussão decorrente da publicação das "Decisões de Copenhague sobre Nomenclatura

---

* Gênero gramatical.
** *Bull. zool. Nomencl.*, *21*(3): 212-221, 1964.
Idem, *21*(6): 474, 1964.

Endereço para correspondência: Rua Itacolomi, 523 - São Paulo - Brasil

Zoológica" insisti na manutenção da dita regra. E, quando chegou o momento de votar-lhe a revisão, ofereci, no dia 20.XI.57, a seguinte declaração de de voto [V.P. (57) 63]:

> "Após investigar profundamente os vários aspectos lingüísticos deste caso, à luz dos argumentos aduzidos em Z.N. (S.) 1020 e Z.N. (S.) 1206, convenci-me — conforme expliquei em carta de 21.VI.57 — de que a evidência favorecia o gênero feminino como o preferível para os nomes genéricos em *-ŏps* (no sentido de *face*, ou de *olho*) no Gr. ὄψ ou ὦψ, das quais a 2.ª forma talvez fosse variante métrica da 1.ª. Tendo apoiado a manutenção da regra que o Congresso em Copenhague estabeleceu, no sentido de se tratarem como femininos os nomes que terminam em *-ops*, voto contra a proposta expressa no V.P. (1957)63 e formulada em Z.N.(S) 1276".

Agora que a referida questão do gênero que se deve atribuir a todos os nomes genéricos terminados em *-ops*, surgiu de novo, e de maneira conflitante, por meio do Caso n.º 18 (B.Z.N. 1963, 20, 1:73), para ser considerada no XVI C.I.Z. (Washington, 1963), sinto que me cabe, seja como zoólogo, seja como antigo professor de grego e de latim, dar as razões deste meu voto.

ANÁLISE LINGUÍSTICA

A - À luz do Código de Nomenclatura Zoológica, "um nome do grupo de gênero deve ser um substantivo no nominativo singular, ou tratado como tal".

B - O conseqüente *-opsis* de vários nomes genéricos apenas representa a transliteração de um substantivo grego. Tal substantivo é ὄψις (com os significados de *aspecto, aparência, face, vista, visão*, etc.), cuja terminação (-ψις) conota a ação exercida pelo verbo: e esta ação significa *aparência* ou *vista* (raiz ο¶ , verbo ὄψομαι). Todavia, ὄψις , por ter sido sempre tratada como feminino em grego (*vide*, p.ex., Friedrich Preisgke - Wörterbuch d. griechischen Papyruskund, Ed. Hubert & Co., Göttingen, Berlin 1927, 2:217; e Brighenti, E. - Diz. Greco Moderno - Italiano, etc. Ed. V. Hoepli, Milano, 1927, 1:457), fica fora de discussão no presente caso.

C — O sufixo *-ops* de nomes genéricos representa:

(a) pela regra, a transliteração de qualquer das formas οψ ou ωψ de um substantivo grego, ambas com o sentido de *aspecto, face, aparência, olho* etc. (raiz ο¶ , verbo ὄψομαι).

(b) por exceção, a transliteração de ὄψ , que é homônima de ὄψ , como em (a), mas denotante de voz, *palavra* (cognata de ἔ¶ος , verbo εἰ¶εῖν).

Desde que, na classificação dos animais, um nome genérico terminado em *-ops* (no sentido de *voz*, como caracter do grupo) dificilmente entraria em cogitação, dada a sua virtual inaplicabilidade [1], na análise só se poderiam versar as referidas formas de *-ops* que denotam *aspecto, face, aparência, olho*, etc.

A esta altura, deve o analista distinguir entre (1) *ŏps* (ὄψ) e (2) *ōps*

AMARAL, A. do Complexidades nomenclaturais em Biologia. Gênero de nomes genéricos terminados em -*ops* Z.N. (S.) 1572.
Mem. Inst. Butantan, 39: 27-36, 1975.

(ὤψ), a fim de poder fixar o gênero atribuível a um nome genérico que esteja considerando:

(1) O 1.º *ŏps* nada mais é que a forma contrata de *ŏpsis* (e as pessoas iletradas são sempre capazes de confundí-las na pronúncia): tal qual ὄψις, ela se tem sempre considerado como substantivo feminino em Grego.

(2) O 2.º *ōps*, qual forma poética de *ŏps* (οψ, raiz οπ verbo ὄψομαι), provavelmente foi introduzido em Grego classico, assim por Homero (século IX A.C.), como por Hesíodo (século VIII A.C.); e apenas foi por eles aplicado no caso acusativo singular como integrante da expressão εἰςῶπα no sentido de *em face*. Em poesia, ὤψ parece ter sido empregado em vez de ὄψ por motivo de conveniência métrica, conforme se pode verificar ao se escandirem os seguintes versos de Homero:

αἰνῶς ἀθανάτῃσι θεῇς εἰς ὦπα ἔοικην	(Ilíada	3:158),
τετλαίη κυνέος περ ἐών εἰς ὦπα ἰδέσθαι	("	9:373),
αὐτάρ ἐπήν ἔλθητε, Διός τ' εἰς ὦπα ἴδησθε	("	15:147),
γνώμεναι· οὐ μέν γάρ τι κακῷ εἰς ὦπα ἐῴκει	(Odisséia	1:411),
αἱματόεντα πέλει, δεινός δ'εἰς ὦπα ἰδέσθαι	("	22:405),
οὐδ'εἰς ὦπα ἰδέσθαι ἐναντίον. Εἰ δ'ἐτεόν δή	("	22:107).

Na verdade, caso houvesse a forma prosáica sido usada nestes hexâmetros, o 5.º pé em (a), (b), (c), (d) e (e) e o 2.º em (f) teriam todos sido formados por 3 silabas breves, quebrando assim o ritmo desses belos versos, falta esta inadmissível em Homero. Este argumento também se aplica ao último exemplo dado por H.G. Liddell & R. Scott (Greek-English Lexicon, Ed. Clarendon Press, Oxford 1951, 2: 2.042), *viz.*, Hesíodo — Opera et Dies : 62, onde o dáctilo ὦπαι igualmente se teria tornado um tríbraco, e esta é outra impossibilidade, já agora da parte de Hesíodo.

Com relação à forma poética ωψ, duas outras questões exigem exame separado: (I) a forma plural inflectiva; (II) o gênero e o sentido

(I) *Plural* — Admite-se que ὤψ, como nome da 3.ª declinação, possui duas formas de plural: a normal ὦπες (nom.: ὦπας, acus.); e a anormal ὦπα (nom. e acus.) que ocorre em Platão (*in Cratylus*: 409C) - ὀτί τά ὦπα 'αναστρέφειν ["porque ela (a luz brilhante) obriga os olhos a se desviarem"].

(II) *Gênero e sentido* — O gênero varia de acordo com o número e o sentido deste nome: (a) No singular — quando denota *face, aspecto, aparência*, é em geral considerado feminino; todavia, quando significa *olho, vista, visão*, é emoregado como masculino; (b) No plural (e então ambas as formas, a normal ὦπας e a anormal ὦπα, têm apenas o significado de *olhos, vistas*) a forma anormal surge como neutra no único exemplo que se conhece

[1] Quando morto — para integrar coleções de museu — não pode ter *voz*; e, quando vivo, raramente tem *voz* que possa ser descrita ou caracterizada numa descrição, de base morfológica em geral.

na literatura, e este é justamente o da supra-citada expressao de Platão (*in* Cratylus: 409C).

Finalmente, devem ser acentuados mais dois pontos a fim de facilitar a todos a compreensão desse intricado problema, a saber:

(a) Em Nomenclatura, nenhuma forma plural está em jogo, visto que um *nome genérico*, por definição, deve ser um substantivo no nominativo singular. Por conseqüência, a nossa escolha se restringe ou confina, limitada como fica, apenas entre o feminino singular e o masculino singular como indício do gênero que se deve atribuir a qualquer nome composto sob exame para definir um gênero.

(b) Caso o elemento final (conseqüente) *-ops* do nome genérico tivesse o sentido de *olho* ou *vista* como carácter proeminente escolhido para definir um gênero animal, então este gênero (*genus*) podia ser considerado masculino. Do contrário, isto é, quando ele conota *aspecto* ou *face* como o escolhido carácter do gênero, então o substantivo composto é feminino.

COMENTÁRIO

Felizmente, apenas em exemplos bastante raros será o caráter *olho* usado para definir um gênero (*genus*), porquanto ele é tão instável e tão freqüente e profundamente mutável após a morte e a preservação de animais (e todo trabalho taxonômico em Zoologia é baseado virtualmente em exemplares preservados) que, para fins práticos, podemos chegar, mediante eliminações sucessivas, a estabelecer a seguinte regra geral: Onde o térmo final (conseqüente) do nome genérico é *-ops* (procedente de ὄψ = *-ŏps*, ou de ὦψ = *-ōps*), o substantivo composto, correspondente a esse nome genérico, é feminino, sobretudo quando tal sufixo (terminação *-ops*) traz a idéia de *aspecto* ou *face*. Isto representa aparentemente a grande maioria dos casos por considerar em Nomenclatura Zoológica. Conseqüentemente e tanto mais que o gênero masculino representa a exceção neste caso, seria, do ponto-de-vista lingüístico, incorreto usá-lo com base para regra do gênero atribuível a nomes terminados em *-ops*.

A fim de tornar o assunto ainda mais fácil para aqueles que não são versados em tais complexidades da lingüística, poder-se-ia até estabelecer que a palavra ὦψ (*-ōps*), sendo apenas uma *forma poética* de ὄψ (*-ŏps*), não carece de ser considerada na determinação do gênero para fins de Nomenclatura Zoológica. Isto deixaria para consideração, como o conseqüente *-ŏps* em nomes genéricos baseados em substantivos compostos do Grego, apenas a palavra ὄψ (*-ŏps*). Isto, todavia, não representa problema, porquanto, no sentido, seja de *face* ou de *olho*, é estrictamente feminino.

A divulgação do fato de até o gênero de ὦψ (no sentido de *aspecto*) ser feminino é geralmente imputada a Gaisford (*in* Etymologicum Magnum, 1848). Sem embargo de tal asserção, o próprio gênero feminino é o aceito nas antigas edições de tão conceituados léxicos como os seguintes:

1. Henricus Stephanus — Thesaurus Graecae Linguae. Ed. F. Didot, Paris 1572, vol. 8, p. 2150;

2. Fridericus Sylburgius — Etymologicum Magnum. Ed. H. Commelini, Heldelberg 1595, p. 139 (col. 4).

Quanto a dicionários modernos, sobretudo dos que são facilmente encontrados em instituições científicas à base da preferência nacional, os seguintes (além do conhecido H.G. Liddell & R. Scott — *loc. cit.*) podem ser citados como atribuindo a *-ops* (ωψ , singular) apenas o gênero feminino:

1. Bailly, A. — Dict. Grec-Français, E. Hachette & Cie., Paris 1950, p. 1433.

2. Boisacq, E, — Dict. Étymol. L. Grecque, Ed. C. Winter Heidelberg 1950, p. 1085.

3. Demetrakos, D. — Méga Lexikón t. Hell. Gloss., Ed. D. Demetrakos, Athens 1950, vol. 9, p. 8056.

4. Hofmann, J.B. — Etymol. Wörterb. d. Griechischen, Ed. Oldenbourg, München 1949, p. 433.

5. Rocco, L. — Vocabol. Greco-Italiano, Ed. D. Aleghieri & S. Lapi, Genova 1943, pp. 1384, 2074.

6. Yarza, F.S. — Dicc. Griego-Español, Ed. R. Sopena, Barcelona 1954, pp. 1001, 1547.

Atualmente parece quase impossível tirar a limpo a veracidade de certos documentos do Grego antigo (de modo a provar ou reprovar várias afirmações encontradas na literatura) sobretudo pelo fato de haver a língua de Homero e Hesíodo, de Aristóteles e Platão, em sua longa evolução, sofrido influências estranhas e deformantes, sobressaindo-se a Bizantina como a primeira e a mais antiga entre elas.

NOMES MITOLÓGICOS

Resta examinar o gênero (gramatical) que se deve atribuir a tais nomes, terminados em *-ops* de origem mitológica ou histórica, quais *Cecrops, Cercops, Cyclops, Glaucops, Merops, Pelops*, etc., todos os quais pre-existiam na literatura greco-latina como substantivos compostos aplicados a homens ou divindades masculinas. O gênero (gramatical) de todos esses nomes também foi predeterminado na língua que primeiro os usou. Quando normalmente aplicados a seres machos reais ou hipotéticos, tais substantivos têm sempre sido tratados como nomes próprios masculinos:

1. Buttmann, Ph. K. — Lexicologus o. Beitr. z. griech. Wort-Erklärung Ed. Berlin 1867, p. 67;

2. Stephanus, Henricus — loc. cit., vol. 8, p. 150.

PONTOS ESSENCIAIS

(1) Um nome genérico (singular, por definição) não se pode basear no plural de qualquer étimo.

---

(2) Uma regra em Nomenclatura não se pode basear na *forma poética* (que representa em geral uma *licença* ou *exceção*) de qualquer étimo.

Leia-se na 2.ª parte * (tradução) deste trabalho o original do seguinte parecer·

COMMENTS ON THE GENDER OF GENERIC NAMES ENDING IN -OPS Z.N. (S.) 1572

By C.W. Sabrosky (U.S. Department of Agriculture, Entomology Research Division, Washington, D.C., USA.

* B.Z.N., 1964, **21** (3): 215-217

Leia-se na 2.ª parte * (tradução) deste trabalho o original do seguinte parecer:

By Jasper Griffin (Balliol College, Oxford)
Classical Adviser to the International Trust for Zoological Nomenclature

* B.Z.N. 1964. **21** (3): 217-218.

Continuação do parecer de Afrânio do Amaral:

Em minha prévia contribuição ao Caso n.º 18, escrita de modo impessoal e simplificado para tornar o assunto facilmente compreensível, apenas aflorei alguns aspectos filosóficos que considerei dignos de atenção.

Ao ser agora citado nominalmente no Comentário que o prof. J. Griffin foi chamado a preparar para publicação neste "Bulletin"; e havendo, entrementes, sabido indirectamente da existência de cartas que o prof. Grensted [1] escrevera ao Secretariado sobre este mesmo caso — sem que eu tivesse acesso ao assunto nelas contido — sinto-me na obrigação de redigir a presente nota adicional (não somente para confirmar o resultado de minhas prévias pesquisas e conclusões, mas para esclarecer, mediante análise objctiva e despreconcebida, alguns argumentos que têm sido aduzidos desde então), na esperança de tocar, dest'arte e para o benefício dos nossos leitores, em todos os aspectos importantes de que tais documentos se possam ter ocupado.

Ao fazê-lo, tentarei ordenar e considerar a questão fundamental que se destaca em assunto tão complexo.

Forma poética: Em seu comentário, o prof. Griffin gentilmente admitiu que a dita "palavra (*ōps*) era poética e rara: nos poetas antigos jamais foi usada de modo a revelar-lhe o gênero". Minha tese, minha principal afirmação lingüística, que objetivou o esclarecimento dos nomenclaturistas, tem sido assim confirmada. Todavia, peço vênia, agora, para adir que, na minha modesta opinião, a disputa entre os velhos gramáticos gregos resultou do fato de haver a dita palavra sido, durante algumas gerações, usada como substan-

---

1 Laurence W. Grensted, saudoso mestre, professor emérito da Universidade de Oxford e ex-conselheiro clássico do Secretariado da Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica (Londres).

tivo defectivo, desprovido de forma nominativa singular que pudesse decidir a questão de maneira definitiva.

A forma nominativa -*ōps* deve ter aparecido nos trabalhos de tais gramáticos como mera decorrência de outras formas do caso gramatical (*ōpa, ōpas,* etc.), criadas, por simples conveniência métrica, no remoto período de Homero.

Sabe-se, à luz de recentes pesquisas bibliográficas e históricas, que o aparecimento da dita forma (*ho ōps*) surgiu no tratado de Aretaeus sobre o tratamento de moléstias agudas e crônicas (Peri therapeias oxeōn kai khronikōn pathōn). Todavia, este trabalho médico, escrito em dialeto jônico, foi publicado no fim do segundo século A.D., correspondendo assim ao fim do período greco-romano da literatura grega: ele se acha, tanto no tempo quanto na qualidade, longe de satisfazer às exigências do C.I.N.Z. [Código: artigo 29 (a) (i)], tanto que não pode ser (nem tem sido jamais) considerado como uma publicação clássica do grego antigo ("ancient Greek").

[A este propósito é taxativo o Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, Art. 29 (a) (i):

"Onde ocorre no Código, a palavra "Latim" compreende o latim antigo, medieval ou moderno, ao passo que a palavra "Grego" apenas se refere ao "grego antigo".]

Nota: Vários zoólogos e nomenclaturistas (inclusive, eu próprio) chamados a expor sua opinião sobre o gênero atribuível a -*ōps, olho,* tiveram que recorrer a indicações zoo-estatísticas a fim de justificar sua preferência pelo gênero masculino ou feminino. Conquanto as estatísticas disponíveis revelem que os exemplos com o sentido de *olho* representam a minoria (exceção), tem-se verificado que o sentido de -*ōps* não tem sido, em grande número de nomes de gêneros zoológicos, claramente afirmado pelos seus autores, nem pode mais constituir objeto de apuração cuidadosa, confiável e completa. Felizmente para nós, a dita verificação — relativa à inexistência de -*ōps* no nominativo singular em "grego antigo" — remove tal dificuldade e estabelece claramente a impossibilidade de considerar masculino o termo -*ōps* quando conseqüente de nomes genéricos de animais.

Forma nominativa - Ainda mais: desde que o referido substantivo não possuia a forma nominativa singular em "grego antigo", não pode essa mesma palavra ser invocada como parte de qualquer nome em nível de gênero, visto que o Código (C.I.N.Z.), em seu artigo 11 (f) exige que ela esteja no nominativo singular ou seja considerada como tal:

"O nome do grupo de gênero deve ser um substantivo no nominativo singular ou ser considerado como tal".

— *ōpsis -ōps*: A ligação entre estes dois substantivos pode ser encontrada, por exemplo, no nome próprio *Aethiops,* cujo conseqüente deriva de -*opsis, face,* segundo Scheller (Riddle transl.) Totius Latinitatis Lexicon, Oxford, 1875.

— *ōps -ōps*: A ligação existente entre estes dois termos (formas prosódicas) pode ser descoberta na evolução de seu étimo comum e simplificado -op, através do grego e de outros idiomas indo-europeus. É considerada em

grego como exemplo de alterância quantitativa, a qual se manifesta na inflexão revelada pela dita raiz (*op*), isto é, em um dos três étimos que intervêm na formação do correspondente verbo *horaō, ver*: fut. *ŏpsomai* vs. aor. ōpsamēn, fut. pass. *ŏpththēsomai* vs. aor pass. *ōphthēn.*

Gênero - Com relação aos nomes próprios, ou comuns, eu diria que, à luz da concepção fundamental de gênero (A Meillet — Introd. Étude Comparat. Langues Indo-Européennes, Paris, 1937), os nomes gregos terminados em *-ops* são masculinos quando definem seres (homens, heróis, divindades, mitos, animais) que são considerados machos. Do contrário, eles são femininos. Este fato banal é suficiente até para explicar por que o gênero masculino é atribuído por todos os lexicógrafos, inclusive os modernos, a nomes em *-ops* (*Cercŏps, Dolŏps, dryŏps, ellŏps*, etc.) a despeito de *-ops* (no sentido de *olho* e de *aspecto*) ser estritamente feminino em grego. Quanto a *Cercŏps*, e *Dolŏps*, seria realmente de admirar, tendo em vista a conotação essencial de gênero, que algum lingüísta competente considerasse tais nomes como femininos, por causa da respectiva terminação. *Vice-versa* um nome em *-ōps* (na hipótese de ser masculino este sufixo quando significa "olho"), tal como *Glaucōps, de olho azul*, seria feminino quando definisse uma divindade fêmea.

Por conseqüência, este argumento de gênero (gramatical) está fora de discussão: é inaplicável quando se trata de esclarecer a presente controvérsia nomenclatural.

Nota: No tocante ao nome próprio *Merŏps*, que é masculino, seu conseqüente procede do étimo simplificado *oks* (*ops*) com o sentido de *voz*, sendo *ŏps* também feminino com tal significação. Análise mais profunda dos fatos relativos a estes exemplos do gênero revela que *ŏps* procede realmente de duas raizes diferentes: OK+ (> OP), Lat, *ŏc-ulus*, Gr. *ŏps-is*, e WOK+ (> -vOKS), *Lat. vox*, ambas as quais estão sujeitas a inflexão por alternância quantitativa. Sua aproximação sob *ops* parece haver-se produzido por intermédio das formas flectivas *osse* (> *okje*) da primeira e ossa (> *oksa*) da segunda. Ainda mais: tal alternância compreende-se dentro dos limites de outro bem conhecido fenômeno lingüístico e que se chama variação de vocalismo (F. Sommer — Hb. Latein. Laut - u. Formenlehre, Heidelberg, 1948), o qual também tem sido invocado para explicar a ligação *-ŏps -ōps.*

Dicionários - À lista dos léxicos facilmente disponíveis (e em várias línguas modernas), todos a considerarem *ōps* (sing.) como substantivo feminino e assim citado na 1.ª parte deste trabalho, o seguinte pode ser acrescentado: Pape, X., Griech. - Deutsch. Wörterbuch, Brunswig, 1880.

Na minha referida lista eu inclui os principais léxicos que são considerados "dicionários padrões" sobre o grego, consoante exigência feita pelo Código [C.I.N.Z.: Art. 30 (a) (i)]:

"Um nome do grupo de gêneros que represente uma palavra em grego, ou latim, ou nela termine, recebe o gênero (gramatical) que lhe conferem os di-

---

* Forma simplificada (para uso de não especialistas) de OK^{w} e WOK^{w}: A. Meillet & J. Vendryes - Tr. Gramm. Comparat. Langues Classiques. Paris, 1948.

cionários padrões de grego ou de latim, a menos que a Comissão decida o contrário".

Resumo: Os aspectos glotológicos e nomenclaturais relevantes nesta questão podem agora ser rapidamente resumidos assim:

1. O termo *ōps* com o sentido de *olho* não pode, à luz do Código, ser invocado em Nomenclatura Zoológica, visto que a sua forma nominativa singular não existiu em "grego antigo".

2. O único étimo que, à luz do Código, pode ser corretamente atribuido a nomes genéricos terminados em *ops* é *ŏps*, o qual é estritamente feminino e possuidor da tripla conotação de *olho, aspecto* e *voz*.

3. Esta conclusão, lingüística e lógica, parece satisfazer às aspirações de todos os meus confrades, Comissários e lingüistas em geral, com os quais eu me tenho ultimamente correspondido à procura de "uma decisão para conferir um único gênero (gramatical) a tais nomes, sem considerar a derivação lingüística de tais nomes" (palavras textuais de Holthuis), ou "uma Regra que torne as coisas tão simples de manobrar quanto possível" (expressão de Lemcke), ou "u'a maneira de evitar o esforço de todo desnecessário de rememorar qual é masculino e qual é feminino" (modo de sentir de Follett).

Reflexões finais - Esta solução simplificada tem a grande vantagem de não ser arbitrária. Ela é cientificamente correta. Em face da crescente oposição que o trabalho da Comissão Internacional vem encontrando, e que procede de vários quadrantes, parece pouco sábio e inoportuno estarmos novamente a dar demonstração de absolutismo e, à base de falsas premissas, invocar a Cláusula de plenos poderes contra o restabelecimento da Regra de Copenhague (b) (III), resultante da Proposta 84, Provisão 7, a qual era lingüisticamente correta e inteiramente despreconcebida. Devemos lembrar-nos que a atual Nomenclatura já tem sido chamada de "uma espécie de monstro: virtualmente não existe mais um zoólogo que possa facilmente localizar e interpretar a regra que ele pretende aplicar. A nomenclatura zoológica já tem passado por experiências suficientemente tempestuosas e cheias de perigo — quais aquelas que decorrem de rivalidade nacional, interpretação do *liberum veto*, aplicação da lei de prioridade e, ultimamente, as questões relativas a *nomina conservanda* e *nomina oblita* — para ser posta em risco pela nossa Comissão mediante uso injustiçado de plenos poderes neste caso.

ADVERTÊNCIA

1. Desde que -*ŏps*, ao contrário de -*ōps*, obedece ao Art. 11 (f), Art. 11 (f), Art. 29 (a) (i) e Art. 30 (a) (i) das exigências do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica quando aplicadas a nomes do nível de gênero;

2. Desde que o texto do atual Código Internasional de Nomenclatura Zoológica, aprovado pela Comissão Internaciónal de Zoologica, foi adotado pelo XV Congresso Internacional de Zoologia;

— nenhuma alteração que se introduza nesse texto — até por efeito de má interpretação ou má aplicação de qualquer de suas provisões e que torne

AMARAL, A. do Complexidades nomenclaturais em Biologia. Gênero de nomes genéricos terminados em *-ops* Z. N. (S.) 1572.
Mem. Inst. Butantan, 39: 27-36, 1975.

impossível a promoção de estabilidade e universidade nos nomes científicos de animais — poderá assegurar-se de validez internacional antes que seja explícita e legalmente adotada por um subseqüente Congresso Internacional de Zoologia.

WARNING

1. Since ὄψ as opposed to ὤψ complies with the provisions of articles 11 (f), 29 (a) (i) and 30 (a) (i) of the International Code of Zoological Nomenclature; and

2. Since the text of the present Code, as approved by the international Commission on Zoological Nomenclature, was adopted by the XV International Congress of Zoology:

— No change introduced into that text — whether through misinterpretation or misapplication of any of its provisions or otherwise — which might fail to promote stability and universality in the scientific names of animals will attain international validity until it is explicitly and lawfully adopted by a subsequent International Congress of Zoology."

SUMMARY: *-ops*, as a final expression of generic names in Zoology, could not correspond to ὤψ (*-ōps*), since this form is a defective noun, its nominative only appeared in the singular through the book of the byzantine physician Areteus, which, by definition, could not be taken as "ancient greek". Lexigenically it resulted from *-ŏpsis*, through contraction and, like this, it kept as short its simpleroot vowel; as a short word it also covered the broad polysemous band of: *aspect*, *appearance*, *face*, *view* and, even, *voice*. Therefore, the admission of *-ŏps* in Zoology will infringe upon 2 fundamental prescriptions of our International Code of Nomenclature, to wit: a) art. 11 (f): "A genus-group name must be a noun in the nominative singular or be treated as such"; b) art. 29 (a) (i): "When the word "Latin" is used in the Code it includes ancient, medieval and modern Latin, but the word "Greek" refers only to ancient Greek". Finally, *ŏpsis* (or *ŏps*) and all the other names in *-sis* have always been considered as feminine in Greek.

UNITERM: Generic names ending in *-ops*.

Recebido para publicação em 30-V-1975 e aceito em 28-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 37-50, 1975

POSIÇÃO TAXONÔMICA DE *LYSTROPHIS NATTERERI* (STEINDACHNER). [*SERPENTES, COLUBRIDAE*] *

ALPHONSE RICHARD HOGE, CARMEN LUCIA CORDEIRO e
SYLVIA ALMA DE LEMOS ROMANO
Secção de Herpetologia, Instituto Butantan

RESUMO: Revalidação de *Lystrophis nattereri* (Steindachner) 1869, espécie até o momento incluída na sinonimia de *Lystrophis histricus* (Jan) 1863.

UNITERMOS: Serpentes, Colubridae. *Lystrophis histricus* (Jan) 1863. *Lystrophis nattereri* (Steindachner) 1869.

Durante a revisão dos especimens de *Lystrophis histricus* (Jan) 1863, depositados na coleção do Instituto Butantan, observamos a existência de duas espécies distintas.

HISTÓRICO

1863 Jan descreve *Heterodon histricus* (: 224).

1864 Steindachner (: 223), menciona um exemplar de *Heterodon histricus* coletado por Natterer no interior do Brasil, mencionando todavia que o exemplar se diferenciava da descrição de *Heterodon histricus* por vários caractéres.

1869 Steindachner (: 90), menciona que o exemplar por ele citado em 1864 (: 233), e, procedente do Brasil, pertence à uma espécie nova, *H. nattereri*. Steindachner, não dá uma descrição da espécie nova, mas diz que os dados e gravura, publicados em 1864, permitem facilmente distinguir as duas espécies.

1894 Boulenger (: 152), coloca a espécie *nattereri* na sinonimia de *histricus*. Desde aquela data, todos os autores mantiveram *nattereri* na sinonimia de *histricus*, inclusive Orejas-Miranda 1966 (: 203) e Peters e Orejas Miranda 1970 (: 188).

* Trabalho realizado com auxílio do Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan (FEDIB) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).
Endereço para correspondência: Caixa postal 65 - São Paulo - Brasil

HOGE, A.R.; CORDEIRO, C.L. & ROMANO, S.A.L. Posição taxonômica de *Lystrophis nettereri* (Steindachner). [*Serpentes, Colubridae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 37-50, 1975.

O estudo de 70 exemplares de *Lystrophis histricus* "sensu" Boulenger permitiu-nos constatar que *Heterodon nattereri* Steindachner 1869 é uma espécie válida, passamos pois a redescreve-la.

CHAVE ARTIFICIAL PARA AS ESPÉCIES DE *LYSTROPHIS*

I — Dorsais em 21 séries longitudinais

A — Ponta da cauda pontuda (Fig. 3); olho geralmente separado das sub-oculares; coloração dorsal com 3 séries de manchas pretas ou castanhas, algumas vezes fundidas (Fig. 5); em bandas transversais irregulares; ventrais 123 - 147 .... *dorbignyi*.

B — Ponta da cauda redonda (Fig. 4); olho em contato com as supralabiais; coloração dorsal com sucessivos anéis pretos, amarelos, pretos, vermelhos; os anéis pretos apresentam-se algumas vezes fundidos no meio (Fig. 6); ventrais 153 - 173 .... *semicinctus*.

II — Dorsais em 19 séries longitudinais

A — Coloração dorsal com bandas transversais pretas, estreitas, separadas por espaços vermelhos (Figs. 2, 7 e 12); corpo com 32 - 36 bandas pretas transversais nas fêmeas .... *histricus*.

B — Coloração dorsal com bandas transversais largas, acastanhadas ou cinzentas, não separadas por espaços vermelhos (Figs. 8 e 11); corpo com 15 - 29 bandas acinzentadas transversais nas fêmeas .... *nattereri*.

Lystrophis nattereri

1864 *Heterodon histricus;* Steindachner, *Verh. zool.-bot. Ges* Wien 1864: 233 "1", Taf. VI.

1869 *Heterodon nattereri;* Steindachner, Reise der Osterreichischen Fregatte Novara, Zool. Reptilien: 90.

1894 *Lystrophis histricus;* Boulenger (partim), *Catalogue of the Snakes in the British Museum,* 2: 152.

1898 *Lystrophis histricus;* Koslowsky, *Rev. Mus. La Plata*: 28.

1919-1920 *Lystrophis histricus;* Griffin, *Mem. Carneg. Mus.,* 7: 192.

1966 *Lystrophis histricus;* Orejas-Miranda (partim), *Copeia,* 1966 (2): 203.

1970 *Lystrophis histricus;* Peters and Orejas-Miranda (partim), Catalogue *of Neotropical Squamata.* I. Snakes,: 188.

Localidade tipo: Brasil.

Distribuição: Brasil: Piaui, Distrito Federal, Mato Grosso, Goiás, São Paulo e Paraná (vide Fig. 19).

HOGE, A.R.; CORDEIRO, C.L. & ROMANO, S.A.L. Posição taxonômica de *Lystrophis nettereri* (Steindachner). [*Serpentes, Colubridae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 37-50, 1975.

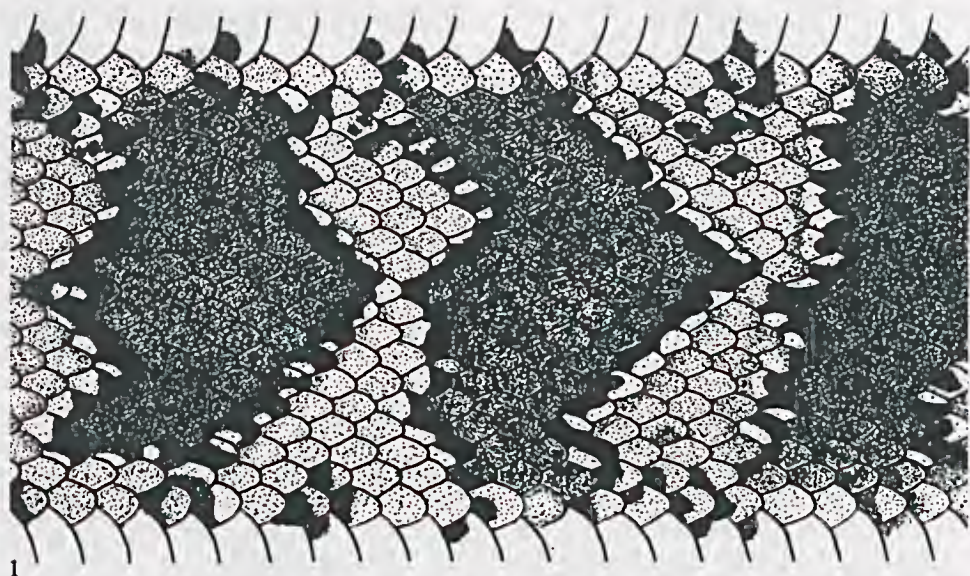
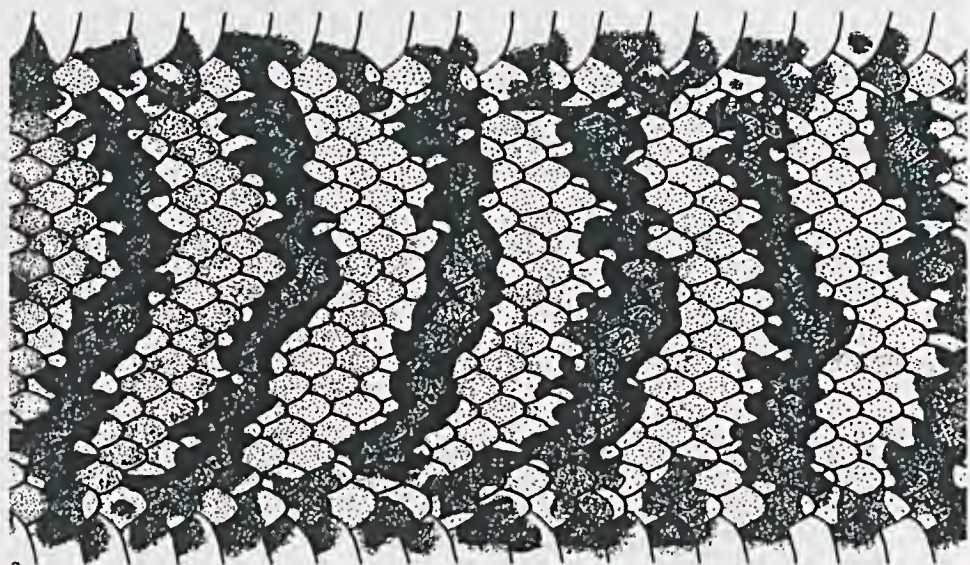
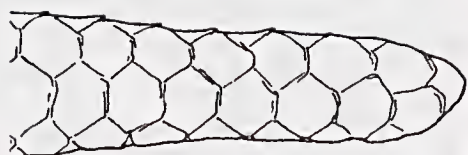



Fig. 1 - IB N.º 9.101. *Lystrophis nattereri* - Vista dorsal. Alfredo Ellis, SP. Brasil.
Fig. 2 - IB N.º 7.626. *Lystrophis histricus* - Vista dorsal. São Leopoldo, RS. Brasil.
Fig. 3 - IB N.º 30.766. *Lystrophis dorbignyi* - Ponta da cauda. Porto Alegre. RS. Brasil.
Fig. 4 - IB N.º 604. *Lystrophis semicinctus* - Ponta da cauda. Pampa Central. Argentina.

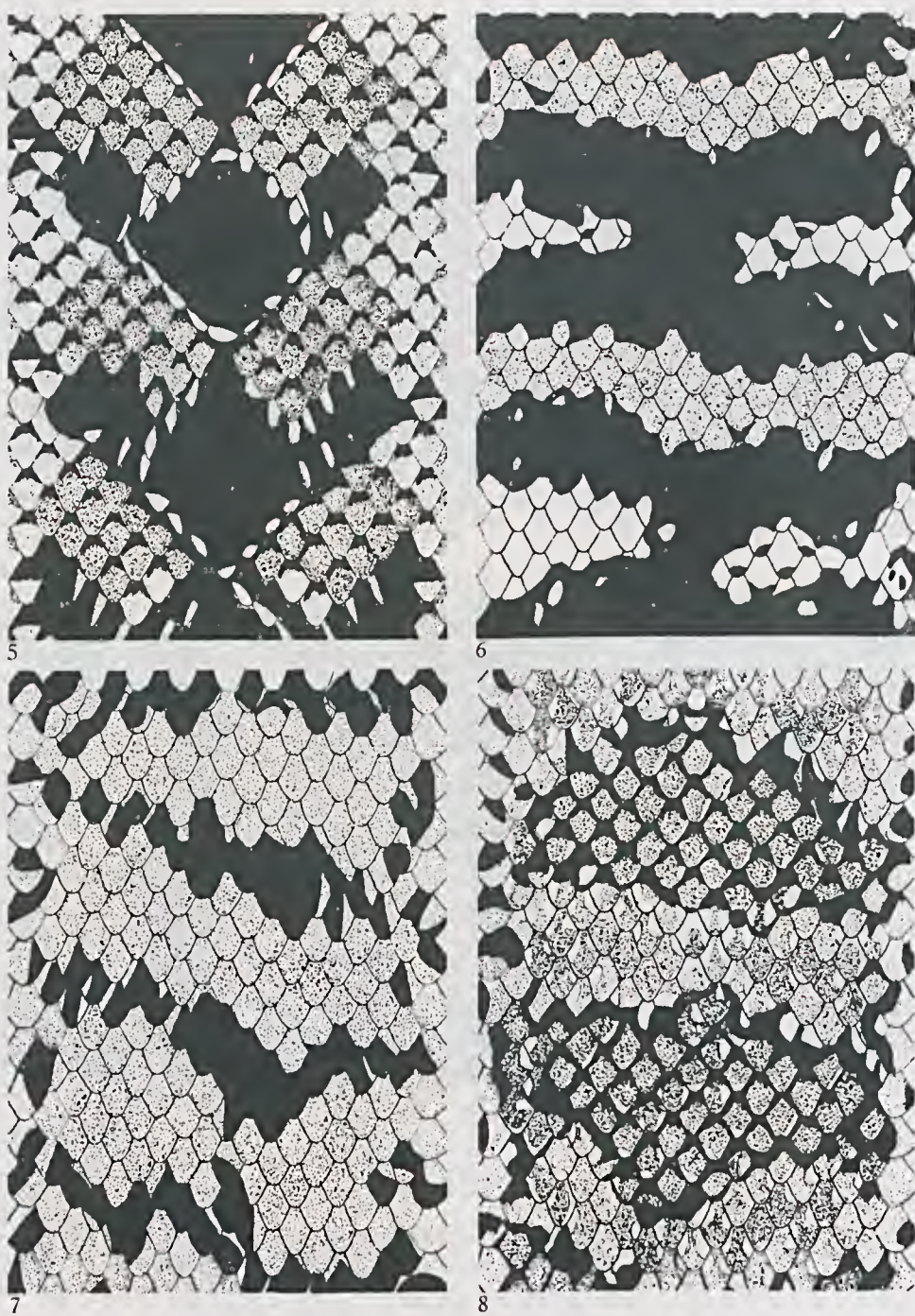
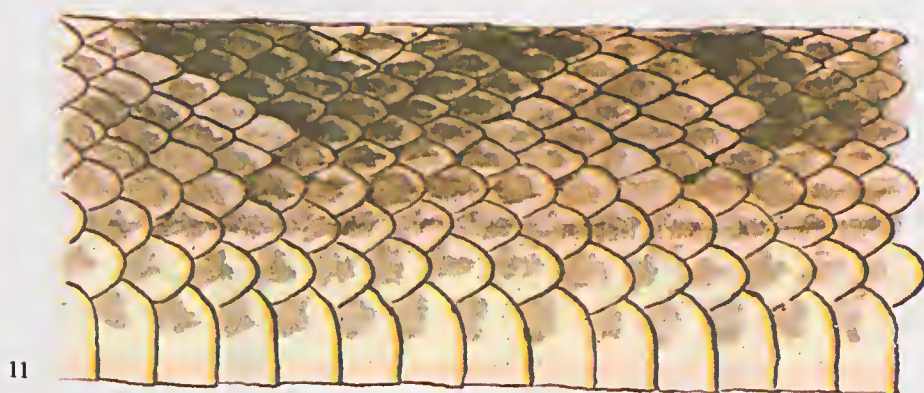
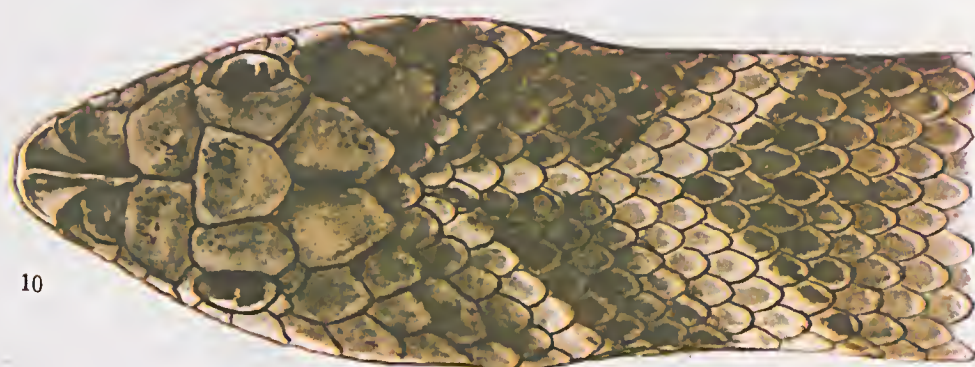
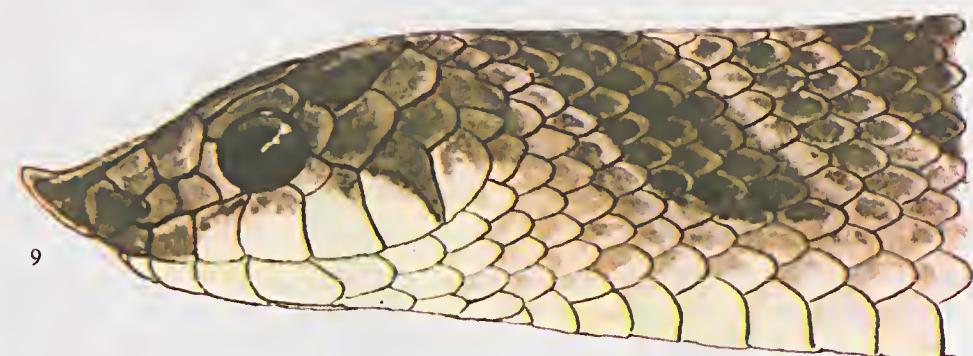



Fig. 5 - IB N.º 20.948. *Lystrophis dorbignyi* - Vista dorsal, Higienópolis, P. Alegre, RS. Brasil.
Fig. 6 - IB N.º 604. *Lystrophis semicinctus* - Vista dorsal. Pampa Central, Argentina.
Fig. 7 - IB N.º 17.623. *Lystrophis histricus* - Vista dorsal, Passo Fundo, RS, Brasil.
Fig. 8 - IB N.º 9.668. *Lystrophis nattereri* - Vista dorsal, Promissão, SP, Brasil.

HOGE, A.R.; CORDEIRO, C.L. & ROMANO, S.A.L. Posição taxonômica de *Lystrophis nattereri* (Steindachner). [*Serpentes, Colubridae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 37-50, 1975.

Figs. 9 a 11 - IB N.º 25.590. *Lystrophis nattereri*, Altinópolis, SP. Brasil.

HOGE, A.R.; CORDEIRO, C.L. & ROMANO, S.A.L. Posição taxonômica de *Lystrophis nettereri* (Steindachner). [*Serpentes, Colubridae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 37-50, 1975.

MATERIAL

Lystrophis nattereri: todos os exemplares perteneem à Coleção do IBH e proeedem dos seguintes Estados e Loealidades:

GO — IBH n.os 10.258 e 10.324 de Rio Verde; 33.107 Ipameri.

MT — IBH n.os 29.075 Campo Grande; 8.229 Corrente; 32.165 Coxim; 4.910 Rio Braneo; 25.345 Três Lagôas.

P I — IBH n.os 1.700 Eng.º Dot-Sta Filomena.

PR — IBH n.os 3.069 Piraquara e 3.068 Serrinha.

SP — IBH n.os 12.942, 31.782, 19.775 e 34.357 Agudos; 25.590 e 20.888 Altinópolis; 17.293 Araçatuba; 9.101 Alfredo Elis; 7.731, 9.256 e 7.713 Avanhandava; 10.020 e 9.960 Aymorés da Paulista (Antigo Ayrés); 33.514 Boa Esperança do Sul; 32.630 e 32.346 Brotas; 6.546 Caiuá; 9.977 Casa Branea; 4.480 Conde do Pinhal; 3.202 Fortaleza; 10.482 e 13.122 Indiana; 33.576 Limeira; 3.272 Promissão; 12.736 Martinópolis; 10.410 Maeedonia; 709 Motuea; 9.469, 8.330, 9.274 e 23.699 Penápolis; 31.319 Paraguassu Paulista; 9.668 Promissão; 209 Pantojo; 1.394 Rio Preto, atual São José do Rio Preto; 16.035 São Joaquim da Barra; 10.498 Toriba; 14.570, 14.579 e 14.556 Urutagua; 10.403 Uparoba; 26.184 e 26.627 Viseonde do Rio Claro.

N.os Coleção	Sexo	Ventrais	Subcaudais	Comprimentos			Anéis
				Cabeça	Corpo	Cauda	
1.700	♀	152	23/23	11,9mm	208mm	21mm	15
29.075	♀	147	26/26	14,7mm	331mm	41mm	23
32.165	♂	144	26/26 + 4	8,3mm	143mm	19mm	22
8.229	♂	148	34/34	11,7mm	250mm	38mm	31
25.345	♂	148	30/30	11,4mm	255mm	38mm	26
4.910	♂	148	29/29	11,7mm	255mm	37mm	21
10.258	♂	152	35/35	8,8mm	164mm	23mm	27
33.107	♂	145	37/37	14,5mm	270mm	49mm	17
10.324	♀	150	28/28	——	162mm	19mm	25
12.942	♀	147	28/28	17,5mm	396mm	51mm	24
31.782	♀	139	30/30	17,1mm	387mm	53mm	26
21.333	♀	153	26/26	17,1mm	383mm	45mm	25
32.630	♀	137	27/27	14,2mm	335mm	46mm	24
16.035	♀	148	23/23	16,7mm	325mm	33mm	26
25.590	♀	148	25/25	13,9mm	282mm	29mm	20
32.346	♀	138	26/26	9,5mm	175mm	19mm	24
17.293	♀	151	23/23	——	411mm	40mm	24
9.469	♀	149	29/29	10,0mm	149mm	18mm	27
13.122	♀	147	22/22	11,4mm	196mm	21mm	28
8.330	♀	151	29/29	——	440mm	58mm	23

Fig. 12 - IB N.º 22.549. *Lystrophis histricus*, São Borja, RS. Brasil.

N.os Coleção	Sexo	Ventrais	Subcaudais	Comprimentos			Anéis
				Cabeça	Corpo	Cauda	
3.202	♀	143	25/25	15,6mm	390mm	45mm	24
9.101	♀	142	23/23	——	373mm	40mm	19
7.731	♀	150	28/28	——	380mm	49mm	25
9.256	♀	149	29/29	——	430mm	56mm	22
10.482	♀	145	23/23	12,0mm	354mm	40mm	26
3.272	♀	152	27/27	15,1mm	375mm	46mm	25
10.020	♀	146	30/30	14,9mm	349mm	47mm	27
1.394	♀	153	26/26	13,8mm	348mm	40mm	24
9.977	♀	146	26/26	15,2mm	374mm	45mm	22
208	♀	145	28/28	16,8mm	383mm	50mm	—
6.546	♀	155	25/25	15,3mm	395mm	43mm	24
23.699	♀	152	28/28	10,5mm	137mm	16mm	26
31.309	♂	141	34/34	14,0mm	280mm	48mm	26
14.570	♂	148	26/26+3	13,1mm	260mm	38mm	27
14.579	♂	147	33/33	15,2mm	305mm	51mm	27
33.576	♂	141	33/33	15,6mm	325mm	52mm	26
10.403	♂	143	28/28	13,8mm	318mm	49mm	23
9.668	♂	—	33/33	12,6mm	290mm	49mm	24
20.888	♂	151	33/33	13,2mm	245mm	37mm	22
27.627	♂	143	34/34	12,9mm	200mm	28mm	21
19.775	♂	141	34/34	11,7mm	225mm	33mm	27
14.556	♂	146	29/29	14,2mm	310mm	43mm	22
26.184	♂	141	32/32	9,2mm	165mm	21mm	25
33.514	♂	144	32/32	12,8mm	240mm	30mm	22
10.410	♂	141	35/35	18,2mm	278mm	50mm	24
209	♂	139	32/32	14,2mm	320mm	53mm	26
7.713	♂	144	32/32	13,3mm	280mm	45mm	24
709	♂	141	32/32	10,7mm	244mm	39mm	19
12.736	♂	148	37/37	12,1mm	166mm	29mm	25
9.274	♂	143	33/33	8,9mm	151mm	21mm	23
10.498	♂	147	29/29	9,1mm	149mm	18mm	24
9.960	♂	140	34/34	10,5mm	150mm	23mm	26
4.480	♂	147	33/33	11,3mm	292mm	55mm	24
3.069	♀	152	29/29	14,5mm	330mm	43mm	21
3.068	♀	147	28/28	13,7mm	325mm	43mm	25

Rostral mais larga do que alta, com carena dorsal; internasais de forma triangular, não em contato por detrás da rostral; pre-frontais muito mais largas do que longas, frontal tão longa ou ligeiramente mais longa do que larga, mais

HOGE, A.R.; CORDEIRO, C.L. & ROMANO, S.A.L. Posição taxonômica de *Lystrophis nattereri* (Steindachner). [*Serpentes, Colubridae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 37-50, 1975.

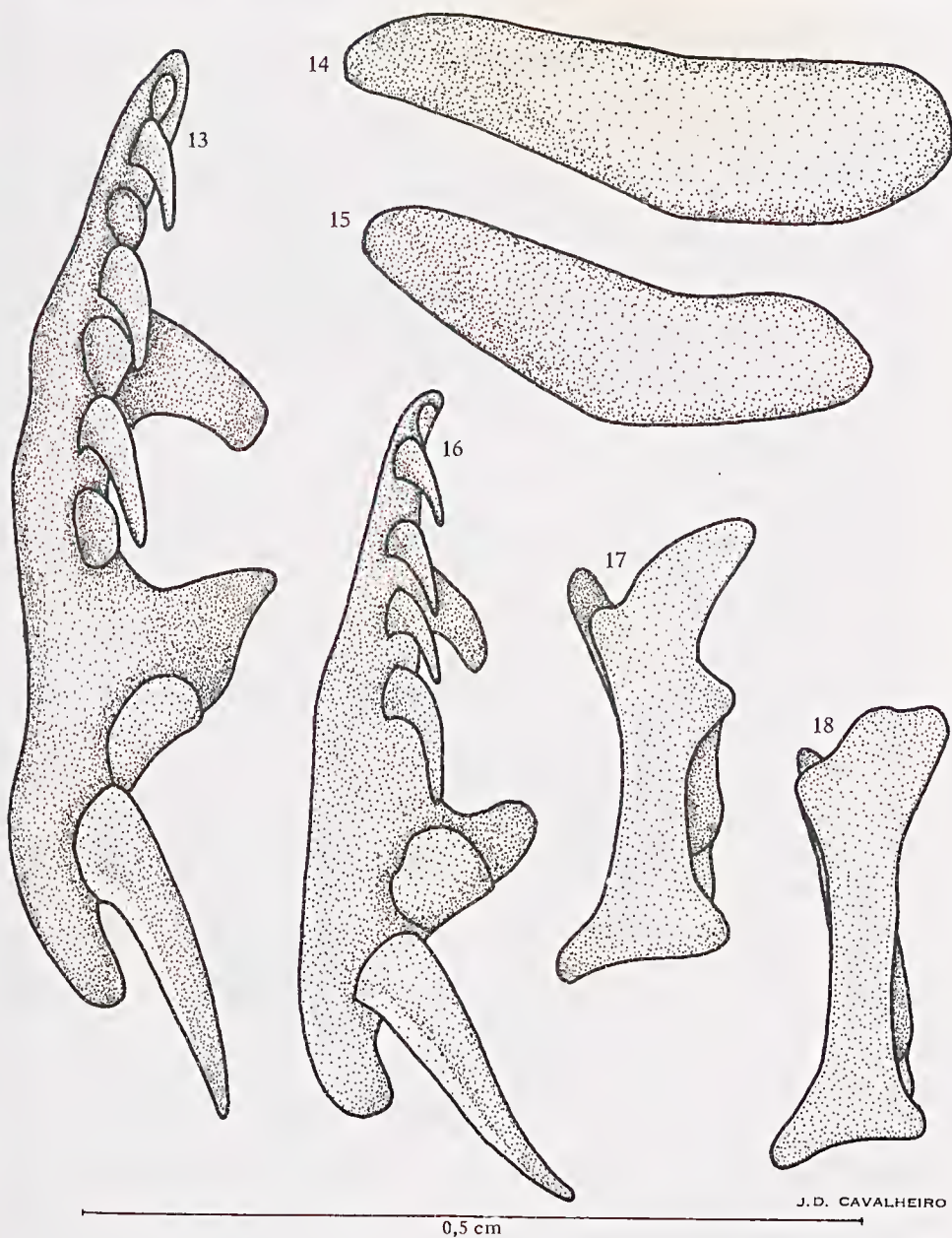



Fig. 13 - IB N.º 17.293. *Lystrophis nattereri* - Maxilar, Araçatuba, SP. Brasil.
Fig. 14 - IB N.º 17.293. *Lystrophis nattereri* - Supra-temporal, Araçatuba, SP. Brasil.
Fig. 15 - IB N.º 7.626. *Lystrophis histricus* - Supra-temporal, São Leopoldo, RS. Brasil.
Fig. 16 - IB N.º 7.626. *Lystrophis histricus* - Maxilar, São Leopoldo, RS. Brasil.
Fig. 17 - IB N.º 17.293. *Lystrophis nattereri* - Preocular, Araçatuba, SP. Brasil.
Fig. 18 - IB N.º 7.626. *Lystrophis histricus* - Preocular, São Leopoldo, RS. Brasil.
Nota-se o número menor de dentes maxilares em *Lystrophis histricus*, (fig. 16) e a presença de uma apófise no preocular de *Lystrophis nattereri*.

curta do que sua distância da ponta do focinho, tão longa quanto as parietais; parietais mais largas do que longas; 1 ou 2 pre-oculares; geralmente 2 post-oculares; temporais 1 + 2, ou 1 + 1; supralabiais 7, 3.ª e 4.ª (excepcionalmente 3.ª, 4.ª e 5.ª) entrando na órbita; infralabiais 7 a 9; 5 (excepcionalmente 3) infralabiais em contato com as mentuais anteriores; as mentuais anteriores muito mais longas do que as posteriores que são muito pequenas; dorsais em 19/19/17 séries longitudinais; ventrais 137 até 155 (139 - 152 nos machos e 137 - 155 nas fêmeas); subcaudais 22 a 37 (28 - 37 nos machos e 22 - 30 nas fêmeas); faixas castanho-cinzentas no dorso, ocupando de 3 até 7 escamas dorsais, separadas por faixas cinzentas estreitas (15-29 faixas pretas nas fêmeas e 17 - 27 nos machos); cabeça com três faixas escuras em forma de V invertido e uma bem larga na nuca, ventre claro manchado de preto. Comprimento total 498mm nas fêmeas e 377mm nos machos.

Lystrophis histricus

1863 *Heterodon histricus;* Jan, *Arch. Zool. Anat. Fis., 2*: 224 "9,15".

1865 *Heterodon histricus;* Jan et Sordelli, *Icon. Gén. Ophid.,* Livr. 11 Pr. IV, fig. 2.

1886 *Heterodon histricus;* Boulenger, *Ann Mag. Nat. Hist.,* (5) XVIII (108): 434.

1893 *Lystrophis histricus;* Boettger, *Kat. Rept. Sammlung Senck. Naturf. Ges.,* (2): 64.

1894 *Lystrophis histricus;* Boulenger (partim), *Cat. Sn. Brit. Mus., 2*: 152.

1898 *Lystrophis histricus;* Koslowsky, *Rev. Mus. La Plata*: 164 e 192.

1925 *Lystrophis histricus;* Devicenzi, *Ann. Mus. Hist. Nat.* Montevideo: 27, Pr. IV, fig. 1-3.

1929 *Lystrophis histricus;* Devicenzi, *Le vie d'Italia e Dell' America Latina, 35* (5): 468 + fig.

1929 *Lystrophis histricus;* Amaral, *Mem. Inst. Butantan 4*: 176.

1939 *Lystrophis histricus;* Devicenzi, Publ. Soc. Linneana, Montevideo: 42 + fig.

1966 *Lystrophis histricus;* Orejas-Miranda (partim), *Copeia*: 203, Figs. 8c-f, 9f.

1970 *Lystrophis histricus;* Peters and Orejas-Miranda (partim), *Cat Neotr. Squamata,* I, Snakes: 188.

Localidade tipo: Desconhecida.

Distribuição: Sul do Brasil, desde o sul de Mato Grosso e Paraná até o nordeste da Argentina, Paraguai e nordeste do Uruguai.

MATERIAL

Lystrophis histricus (Jan) - todos os exemplares pertencem à Coleção do Instituto Butantan e procedem dos seguintes Estados e Localidades:

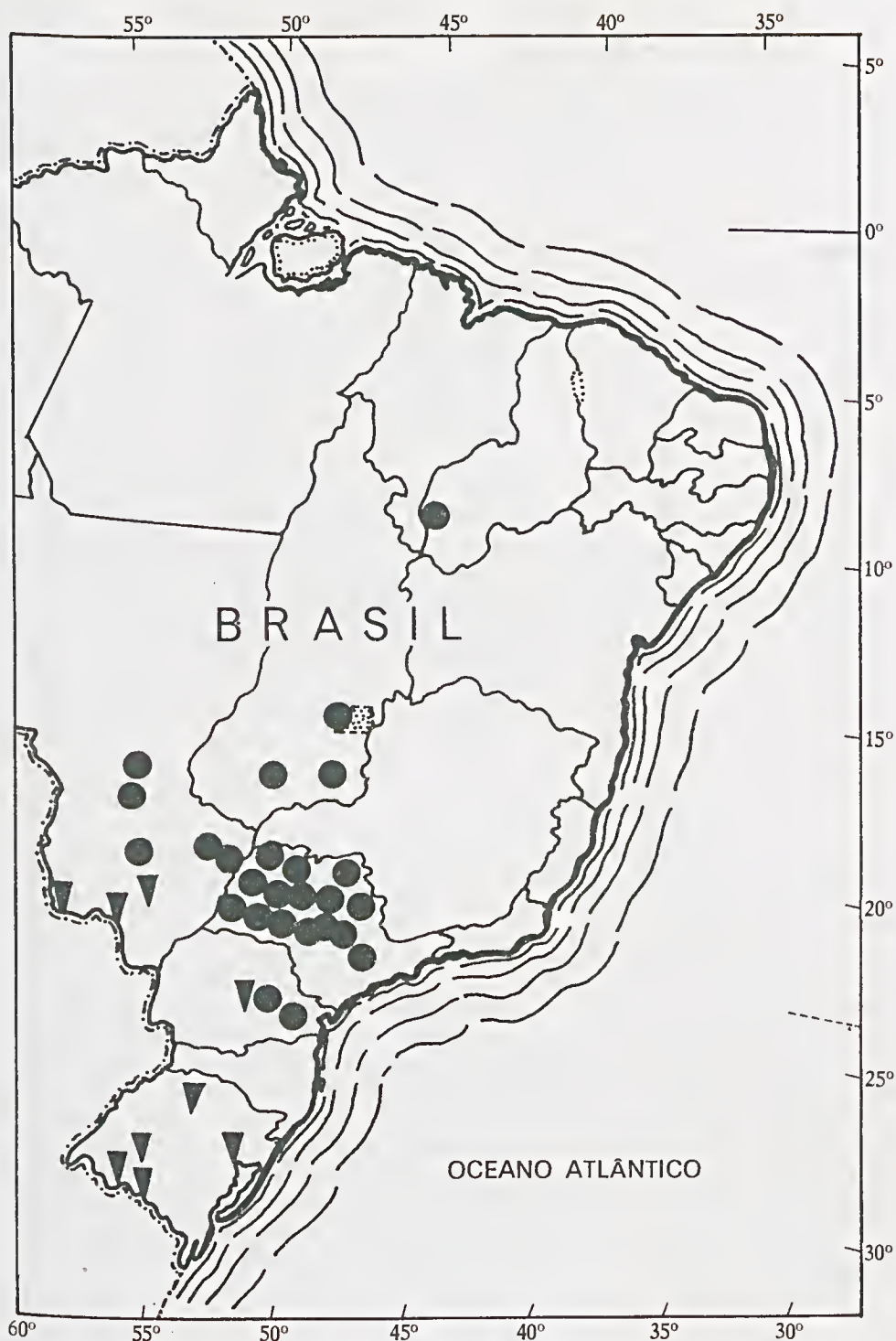



Fig. 19 - Mapa de distribuição: ● *Lystrophis nattereri* e ▼ *Lystrophis histricus*

MT — IBH n.os 26.012 Três Barras; 16.868 Brilhante; 10.387 localidade duvidosa; 16.475 Ponta Porã.

PR — 7.622 Carambei; 25.643, 34.381 Ponta Grossa.

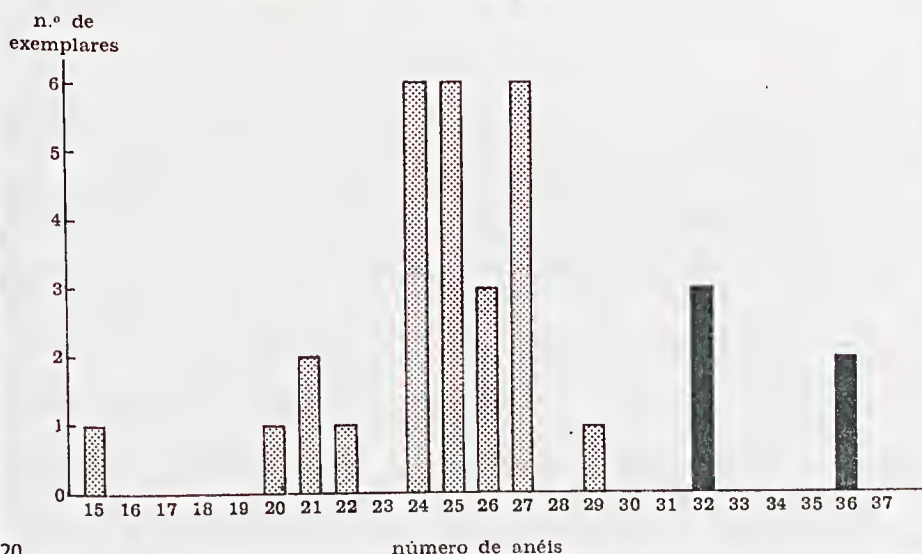
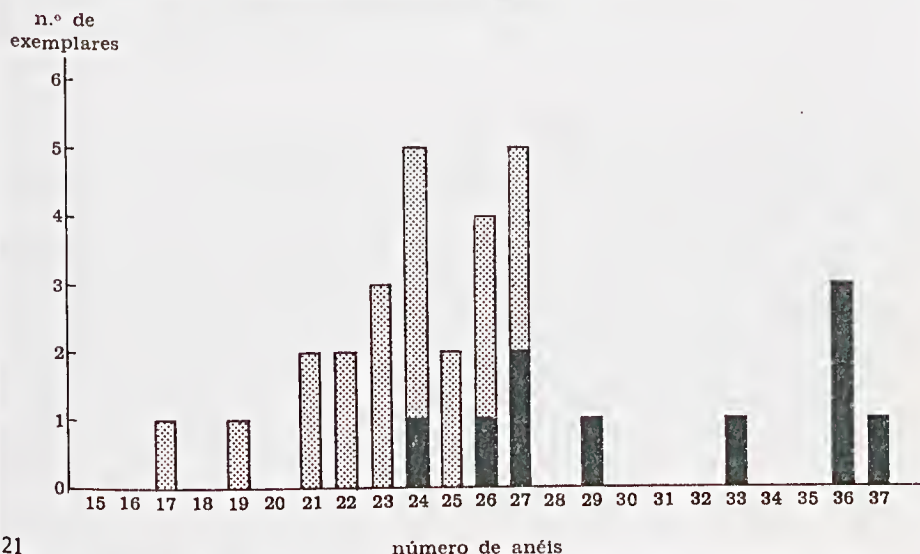
RS — 9.865 Pinheiro Machado; 9.006 São Simão; 17.623, 8.186, 8.185 Passo Fundo; 7.626 São Leopoldo; 10.024 Cacequi; 14.367 Pampeiro.

N.os Coleção	Sexo	Ventrais	Subcaudais	Comprimentos Cabeça	Corpo	Cauda	Anéis
26.012	♂	142	33/33	13,3mm	260mm	43mm	36
16.475	♂	145+1/1	33/33	9,4mm	136mm	19mm	36
16.868	♂	142	29/29	10,9mm	240mm	40mm	36
10.387	♂	136	31/31	10,7mm	228mm	38mm	27
7.622	♂	134	36/36	13,4mm	250mm	43mm	27
25.643	♂	133	31/31	11,4mm	238mm	40mm	24
34.381	♂	137	27/27	15,0mm	281mm	40mm	26
9.865	♂	140	35/35	——	242mm	142mm	33
9.006	♂	137	34/34	11,5mm	215mm	35mm	29
17.623	♂	141	36/36	10,0mm	228mm	41mm	37
8.186	♀	136	27/27	——	375mm	48mm	32
7.626	♀	136	25/25	——	350mm	41mm	36
8.185	♀	137	26/26	17,5mm	376mm	48mm	32
10.024	♀	145	32/32	15,2mm	300mm	41mm	36
14.367	♀	138	29/29	16,8mm	345mm	48mm	32

Rostral mais larga do que alta, com carena dorsal; internasais de forma triangular não em contato por detrás da rostral; pre-frontais muito mais largas, do que longas, geralmente em contato, excepcionalmente separada por uma escama ázigo; frontal tão longa ou ligeiramente mais longa, quanto larga, mais curta do que sua distancia da ponta do focinho, tão longa quanto as parietais, que são mais largas do que longas; 1 ou 2 pre-oculares; geralmente 2 post-oculares; temporais 1 + 2 ou 1 + 1; supralabiais 7, 3.ª e 4.ª (excepcionalmente 3.ª, 4.ª e 5.ª) entrando na órbita; infralabiais 8 a 9; 5 (excepcionalmente 3) infralabiais em contato com as mentuais anteriores; que são muito mais longas do que as posteriores, que são muito pequenas; dorsais em 19/19/17 séries longitudinais; ventrais 133 até 146 (133 - 146 nos machos e 133 - 145 nas fêmeas); subcaudais 25 a 36 (27 - 36 nos machos e 25 - 32 nas fêmeas); faixas pretas estreitas no dorso, ocupando de 1 1/2 até 3 escamas dorsais, separadas por faixas vermelhas largas; (32 - 36 faixas pretas nas fêmeas e 24 - 37 nos machos); cabeça com três faixas pretas em forma de V invertido e uma bem larga na nuca, ventre claro manchado de preto. Comprimento total 424mm nas fêmeas e 321mm nos machos.

Agradecimentos: Ao Sr. Ralph Grantsau pelos desenhos n.os 9, 10, 11 e 12 e ao Sr. João Domingues Cavalheiro pelos desenhos e mapa.

HOGE, A.R.; CORDEIRO, C.L. & ROMANO, S.A.L. Posição taxonômica de *Lystrophis nettereri* (Steindachner). [*Serpentes, Colubridae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 37-50, 1975.

HOGE, A.R.; CORDEIRO, C.L. & ROMANO, S.A.L. Posição taxonômica de *Lystrophis nettereri* (Steindachner). [*Serpentes, Colubridae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 37-50, 1975.

ABSTRACT: Revalidation of *Lystrophis nattereri* (Steindachner) 1869, species included till now in the synonymy of *Lystrophis histricus* (Jan) 1863.

UNITERMS: Serpentes, *Colubridae. Lystrophis histricus* (Jan) 1863. *Lystrophis nattereri* (Steindachner) 1869.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMARAL, A. do Estudos sobre Ophidios Neotrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 4:* 3-271, 1929.
2. BOETTGER, O. Katal. der Reptilien - Sammlung in Mus. Senckenbergischenden Gesellschaft in Frankfurt am Main. Frankfurt am Main, Senckenberg Museu. 1893, ix + 160p.
3. BOULENGER, G.A. A synopsis of the Reptiles and Batrachians of the Province Rio Grande do Sul, Brazil. *Ann. Mag. Nat. Hist., 28:* 423-445, 1886.
4. BOULENGER, G.A. Catalogue of the Snakes in the British Museum (Natural History). London, British Museum, 1894, v. II.
5. DEVICENZI, G.J. Fauna Herpetológica del Uruguay. *Ann. Mus. Hist. Nal. Montevideo*, s. 2, *3*(1): 1-64, 1925.
6. DEVICENZI, G.J. Serpenti Dell'Uruguay. *Le vie d'Italia e dell'America Latina, 35*(5): 467-476, 1929.
7. DEVICENZI, G.J. Ofidios del'Uruguay. *Publ. Soc. Linneana Montevideo*, : 1-53, 1939.
8. JAN, G. Prodromo Della Iconografia Generale Degli Ofidi. IIa. Parte. VII.º Grupo Coronellidae. *Arch. Zool., II*(2): 1-120, 1863.
9. JAN, G. & SORDELLI, F. Iconographie Générale des Ophidiens. v. I, pt. 1-17. Milan, 1860/66. (Reprint). Weinheim, J. Cramer, 1961. (Historia Naturalis Classica, v. 12).
10. GRIFFIN, L.E. A catalogue of the ophidia from South America at present (June 1916) contained in the Carnegie Museum with descriptions of some new species. *Mem. Carnegic Mus.*, *7* (3): 163-228, 1919/1920.
11. KOSLOWSKY, J. Ofidios de Mato Grosso (Brasil). *Rev. Mus. La Plata,* : 25-32, 1898.
12. KOSLOWSKY, J. Enumeracion sistemática y distribucion geografica de los reptiles Argentinos. *Rev. Mus. La Plata,* : 161-200, 1898.
13. OREJAS-MIRANDA, B.R. The Snake Genus *Lystrophis* in Uruguai. *Copeia,* (2): 193-205, 1966.
14. PETERS, J.A. & OREJAS-MIRANDA, B.R. Catalogue of the Neotropical Squamata. Part I - Snakes. *U.S. Nat. Mus. Bull.,* (297), 1970.
15. STEINDACHNER, F. Ueber *Heterodon histricus* Jan. *Verh. zool. bot. Ges. Wien,* : 233-234, Tab. VI, 1864.
16. STEINDACHNER, F. Reise der Österreichischen Fregatte Novara Zool. Reptilien. Wien, Karl Gerald,s Sohn, 1869.

Recebido para publicação em 02-VI-1975 e aceito em 24-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 51-60, 1975

A NEW SUBSPECIES OF *DIPSAS INDICA* FROM BRAZIL. [*SERPENTES, COLUBRIDAE, DIPSADINAE*]

ALPHONSE R. HOGE and SYLVIA ALMA DE LEMOS ROMANO
Department of Herpetology, Instituto Butantan

ABSTRACT: Description of a new subspecies of *Dipsas indica* from Brazil: *Dipsas indica petersi* subsp. nov. and redescription of *Dipsas bucephala* (Shaw) 1802.

UNITERMS: Serpentes, *Dipsadinae. Dipsas indica indica* Laurenti 1768. *Dipsas indica bucephala* (Shaw) 1802. *Dipsas indica cisticeps* (Boettger) 1885. *Dipsas indica ecuadorensis* Peters 1960. *Dipsas indica petersi* subsp. nov.

Identification of the specimens of *Dipsas indica* subsp. in the IBH collection, according to Peter's revision (1960) shows that *Dipsas indica bucephala* (Shaw) 1802 "sensu" Peters (1960: 73) is a complex of two subspecies.

The reason why Peters did not recognize two subspecies is probably the fact that nine of the fourteen specimens at his disposition were either from unknown localities or from São Paulo, Brazil and "the name of the city may be the point of reception rather than the actual place of collection". Peters 1. c. : 77).

The figure published by Shaw (Fig. 1) although poor, permits to recognize a subspecies of *Dipsas indica* characterized by: regular dots on the head (although Shaw's artist did not represent them on the drawing, Shaw mentioned the parietal spots in his description) and a short first dorsal blotch.

The presence of dots on parietals shows its relationship with both coastal and inland population of southern Brazil. The short first dorsal blotch excludes the population of the coastal Atlantic slopes.

Peters (1960 pl. III fig. a, UMMZ 62706 from São Paulo) represents as typical for his *bucephala* a specimen who belongs to the landward slope of southern Brazil.

I maintain here the name of *bucephala* for the subspecies occuring in the landward slopes and interior of southern Brazil since Shaw's, figure shows

* Research supported by the National Library of Medicine (Grant L.M. 00418-01) and Conselho Nacional de Pesquisas (Proc. 2640/66).
Adress: Caixa postal 65 - São Paulo - Brasil

clearly that his specimen belongs to a form with short first dorsal blotch (Fig. 1) instead of the long one observed in the specimens from the Atlantic slope of the coastal range of south eastern Brazil. (Figs. 9 and 10)

Although I have not seen intergrades until now, the new form is so closely related to *D. indica* that I will consider it a subspecies, at least for the moment.

The population of the coastal region of southeastern Brazil is considered as a new subspecies.

DESCRIPTION OF THE NEW SUBSPECIES

Dipsas indica petersi * subsp. nov.

Holotype: IBH n. 23.460, a ♀, from Pedro de Toledo, São Paulo, Brazil, collected by V. Rodrigues, November Ith, 1963.

Diagnosis: A subspecies of *Dipsas indica* Laurenti 1768 characterized by: a unicolor light brown head dorsum with a few dark spots occupying less than one quarter of each plate (Fig. 10); the first pair of dorsal blotches meeting accross the vertebral row, and occupying 14 to 23 scales at the middorsal line (Figs. 9 and 10); the dorsal blotches extending laterally to the ventrals (Figs. 4 and 11); no yellowish-white stippling centered at the base of the dorsal blotches; a more or less distinct white spot on the outer side of blotches (Fig. 11). Ventrals 182 - 196 in ♂ and 175 - 185 in females; caudals 103 - 118 in ♂ and 78 - 106 in ♀.

Relationship: *Dipsas indica petersi* differs from all other subspecies by the extension of the first dorsal blotch which occupies 15 to 23 vertebral scales; differs also from *Dipsas indica indica* Laurenti 1768 and *Dipsas indica ecuadorensis* Peters 1960 by the light brown color of the head with a few spots, instead of dark brown and heavily variegated or striped (Figs. 12, 13 and 14). It differs from *Dipsas indica cisticeps* (Boettger 1885) by the smaller size of the spots on the head shields and the higher number of subcaudals 103 to 117 ♂ and 91 to 106 ♀, instead of 89 to 99 in ♂ and 76 to 92 in ♀ of *cisticeps*. From *Dipsas indica bucephala* (Shaw, 1802) as defined below, it differs by the absence of light stippling centered on the base of the dorsal blotches (Figs. 5 and 8); by the presence of a series of supplementary vertebral white-bordered dark brown stripes (Fig. 2); and by the higher subcaudal counts: 103 - 117 ♂ and 78 - 106 ♀ instead of 80 - 99 ♂, 83 - 89 ♀ in *bucephala*.

Description: Rostral broader than deep, visible from above; internasals half as long as the prefrontals, broader than long; prefrontals as long or a little longer than broad, not entering the orbit; frontal as long or a little longer than broad, shorter than the parietals; nasal divided; loreal entering the orbit; 8 - 10 upper labials (2 or 3 entering the orbit); lower labials 13 - 16. Ventrals and subcaudals as given in the diagnosis. First pair of dorsal blotches meeting on the middorsal line and occupying from 15 to 23 vertebral scales; 17 to 26 dorsal blotches on the body (17 - 21 ♂ and 16 - 26 in females); vertebral row strongly enlarged; dorsals in 13 rows, not reducing to eleven, except in two

* in honor to our friend the late James A. Peters.

HOGE, A.R. & ROMANO, S.A.L. A new subspecies of *Dipsas indica* from Brazil. [Serpentes, *Colubridae*, *Dispsadinae*].
Mem. Inst. Butantan, *39*: 51-60, 1975.

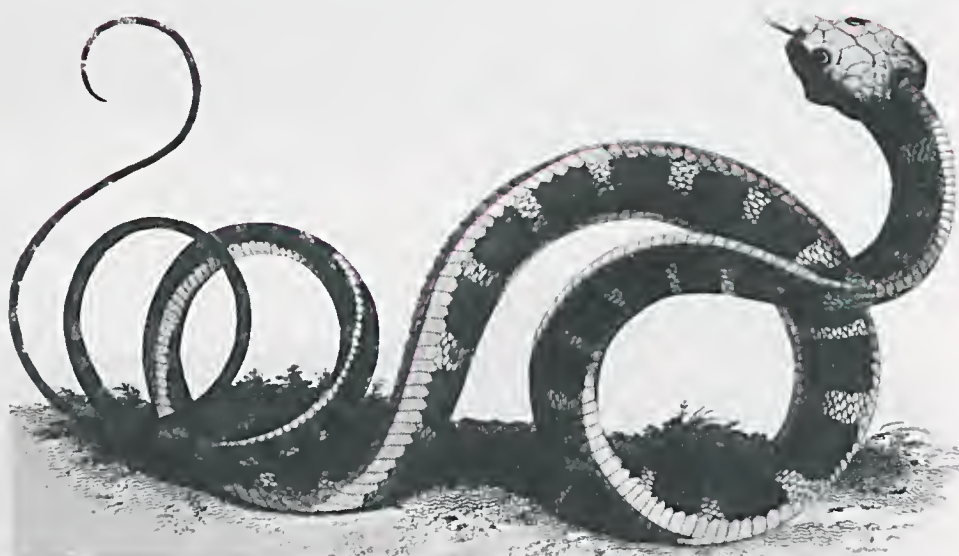



Fig. 1 - Shaw's figure of *Coluber bucephala*

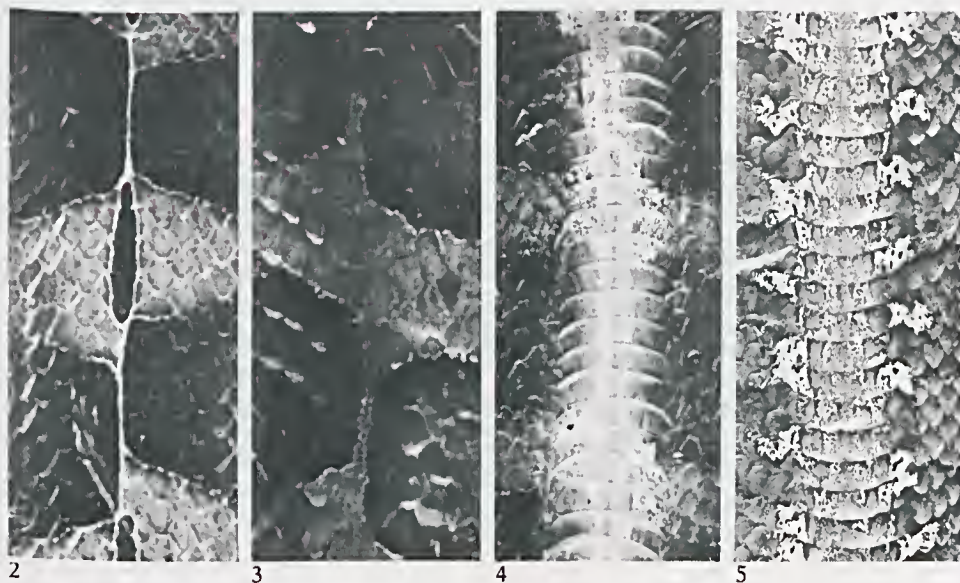
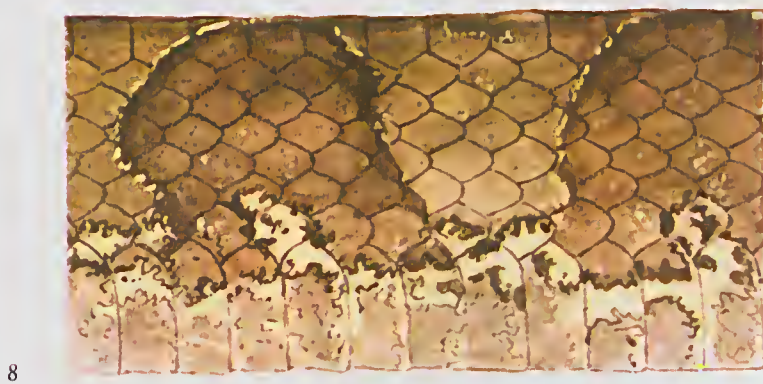
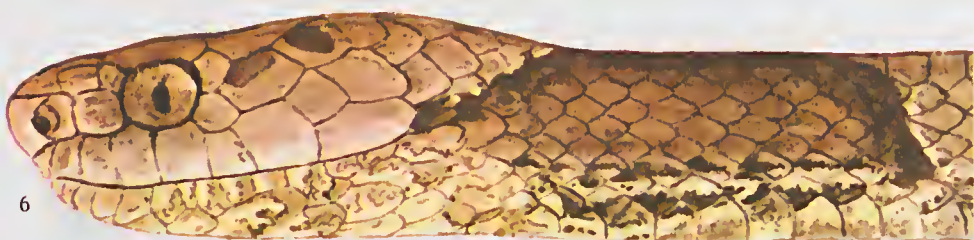
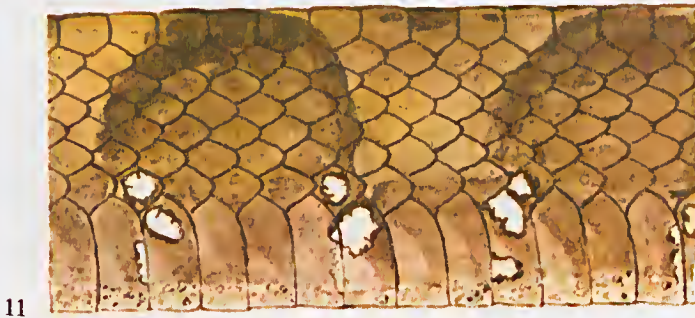
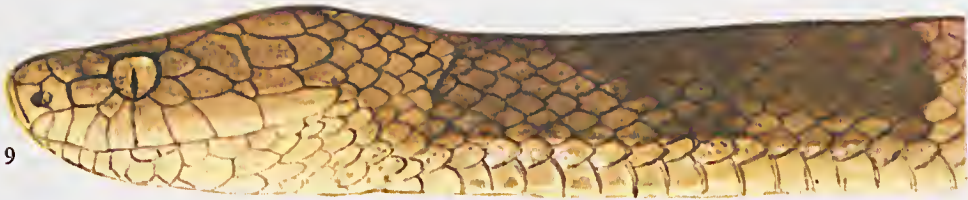



Fig. 2 - *Dipsas indica petersi* IBH 24.169
Fig. 3 - *Dipsas indica bucephala* IBH 9.306
Fig. 4 - *Dipsas indica petersi* IBH 23.631
Fig. 5 - *Dipsas indica bucephala* IBH 7.849

HOGE, A.R. & ROMANO, S.A.L. A new subspecies of *Dipsas indica* from Brazil. [Serpentes, *Colubridae, Dispsadinae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 51-60, 1975.

Figs. 6 a 8 - *Dipsas indica bucephala* IBH 23.404

Figs. 9 a 11 - *Dipsas indica petersi* IBH 23.460 Holotype

specimens. Dorsal ground color of head unicolor light brown, with small dark brown spots occupying less than a quarter of the plates (Fig. 10); generally a small longitudinal stripe on occiput (Fig. 10). Dorsal ground color brownish tan with 16 to 26 dorsal chesnut-brown blotches. The outer ends of dorsal blotches marked at the base with a very distinct white (sometimes irregular) dot (Fig. 11) on the first dorsal row or outer ends of ventrals; the dorsal blotches extending to the ventrals (Figs. 4 and 11); interspaces at middorsal line with a distinct white-bordered dark chesnut-brown stripe (Fig. 2).

Description of Holotype: Rostral as high as broad: internasals less than half the length of prefrontals, broader than long; prefrontals longer than broad in contact with nasal, loreal and preocular; frontal a little longer than broad; shorter than long; frontal a little longer than broad, shorter than parietals which are nearly as broad as long; temporal 2 + 3; loreal a little longer than deep entering the orbit; dorsals 13 - 13, vertebral row strongly enlarged; ventrals 185; anal entire; caudals 28 + n; 9 upper labials (5th and 6th entering the orbit); 14 lower labiais, three first pairs in contact behind the simphysial a (preocular?) intercalated between 4th upper labial and the orbit. Ground color brownish tan with 20 dark chesnut-brown dorsal blotches nearly as wide above as beneath (Fig. 11); not bordered with white except upper side when not alternate; one or two yellowish-white dots on the sides of dorsal blotches situated on 1st dorsal row or ventrals; belly powdered with dark brown, the color of dorsal blotches invading the ventrals (Fig. 11); anterior part of belly light, gradually darker posteriorly. Supplementary light-edged dark-brown stripes on middorsal line between the dorsal blotches.

Range: (Fig. 15). This subspecies occurs on the Atlantic slopes of the coastal range of southeastern Brazil; from the State of Paraná to Espirito Santo, and probably as far north as State of Bahia. The known range is entirely in the broad leaved, tropical humid coastal forest. Two specimens (see map. Fig. 15) although apparently localized out of the limits are:one from the gallery forest of Rio Doce and the other from a region where numerous isolated forests occur.

Paratypes: Brazil: State of Espirito Santo: IBH 15.632 Castelo; IBH 7.441 Itapina (formerly Ita) Mcp. Colatina; CDZ 2.460 Linhares, Soretama; MNR 1.272 Santa Teresa.

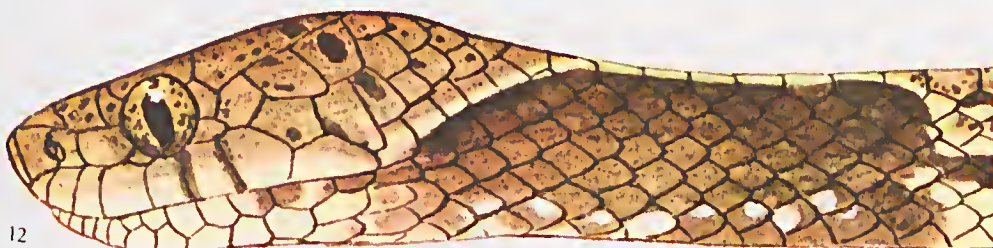
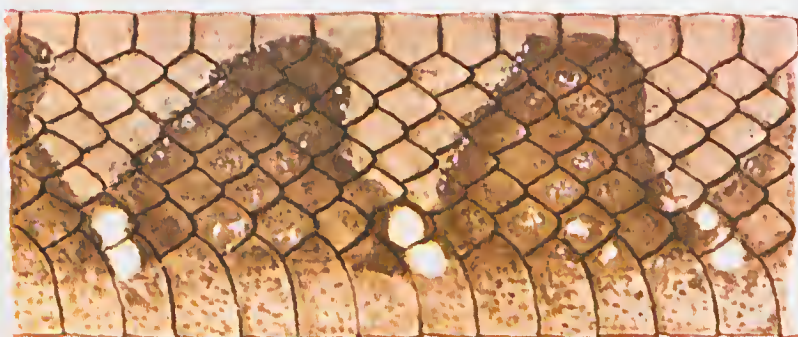
State of Paraná: IBH 7.157 Paranaguá; IBH 827 Antonina.
State of Rio de Janeiro: IBH 15.464 Barcelos, Mcp. São João da Barra; IBH 10.478 and 477 Mangaratiba.

State of São Paulo: IBH 13.137 Cubatão; 12.780 and 23.631 Cubatão; IBH 16.049 Embu-guassu; IBH 5.355 Prainha; IBH 10.391 Santos; IBH 13.938, 13.939, 13.940, 13.941 and 9.244 São Vicente (Praia das Vacas); IBH 2.548 and 2.543 Vicente de Carvalho (formerly Itapema Mcp. Guarujá).

REDESCRIPTION OF *D. INDICA BUCEPHALA*

Dipsas indica bucephala (Shaw)

1802 *Coluber bucephala* Shaw, 1802: 422

1810 *Bungarus bucephalus;* Oppel: 392

Figs. 12 a 14 - *Dipsas indica indica*. All figures IBH 23.935 from Conceição do Araguaia, State of Para, Brazil.

1822 *Dipsas bucephala;* Schinz (in Cuvier): 117 (*partim*)

1854 *Dipsadomorus indicus*; Duméril, Bibron et Duméril: 470 (*partim*)

1858 *Leptognathus indicus*; Günther: 180 (*partim*)

1868 *D.* [*ipsadomorus*] *bucephalus;* Jan: 99 (*partim*)

1894 *Dipsas indica*; Boulenger, 3: 461 (*partim*)

1960 *Dipsas indica bucephala*; Peters: 73 (*partim*)

Type locality: "Ceylon" (in error) restricted to Brazil (Peters 1960: 73).

Holotype: unknown: described on basis of Shaw's (Fig. 1).

Range: (Fig. 15) Brazil, States of Paraná, São Paulo, Mato Grosso (where it probably intergrades with *cisticeps*) and Goiás.

Rostral as broad as deep, or a little broader, visible from above; internasals one third to one half as long as the prefrontals, broader than long; prefrontals as long or a little longer than broad not entering the orbit; frontal broader than long, shorter than parietals; nasal divided or semidivided; loreal a little deeper than long entering the eye: 8 - 9 upper labials (2 or 3 entering the orbit); lower labials 13 - 15; ventrals 181 - 195 in males, 183 - 189 in females; anal entire; subcaudals 80 - 99 in males and 77 - 89 in females.

Dorsal ground color of head unicolor light brown with light edged dark brown spots occupying less than one quarter of the plates (Fig. 7). Dorsal ground color of body brownish-tan with 22 - 33 dark brown blotches (Fig. 7) the first pair in contact at middorsal line (Fig. 7) occupying 4 - 12 vertebral scales. Dorsal blotches edged with yellowish-white stippling on the outer sides of the base of blotches and a stippling of same color centered at the base (Figs. 5 and 8); belly, at least anteriorly, with brown dots interspersing yellowish white irregular bordus (Fig. 8).

Material: *State of São Paulo*: IBH 5.412 Araçatuba; IBH 16.664; 8.665, 7.377, 6.103, 2.542, 1.704, 1.307, 1.720, 7.848, 7.822, 7.392 and 7.387 from Aurora — Mcp. Descalvado; 1.015 Banharão Mcp. Jaú; 10.336 Brodoski; 13.121 Brotas; 8.440, 5.192, 5.193 Brumado; 9.266 Cajuru; 7.795 Corredeira Mcp. Cajuru; 7.498 Coronel José Egydio Mcp. Tambaú; 2.672 Córrego Fundo; 7.534 Cravinhos; 9.799 and 9.809 Domingos Vilela Mcp. Ribeirão Preto; 7.849 Esmeralda; 5.021 Faveiro; 8.466 Fernão (formerly Fernão Dias) 8.466 Gália; 10.039 Gália; 10.348 Garça; 5.406 Guatapará Mcp. Ribeirão Preto; 7.850; 5.639 Itapeva; 1.166 Itobi Mcp Casa Branca; 16.295, 4.757, 4.371 and 6.847 Jacaré Mcp. São Carlos; 9.804 Jacareí; 6.088 Jaguariuna (formerly Jaguari); 9.306 Jurucê (formerly Sarandi) Mcp Jardinópolis; 8.043, 6.067, 4.440 Leme 692 and CDZ 1.516 Lençois Paulista (formerly Lençois) 2.679 Loreto Mcp. Araras; 9.551 Mocóca; 6.925 Ourinhos; 898, 2.675 Palmital; 5.592, 4.514 Pinhal (formerly Espirito Santo do Pinhal); 9.549 Piratininga; 9.234 Porto Ferreira; 9.930 and 6.168 Ressaca Mcp. Mogi-Mirim; Santa Cruz das Palmeiras 2.673, 1.837, 1.828, 1.375, 1.098; 1.001 Santo Aleixo (on the margin of Serra Negra River) Mcp. of Serra Negra; IBH 7.087 Santo Antônio do Jardim (Formerly Jardim); IBH 1.010 Santa Rita do Passa Quatro (formerly Santa Rita); IBH 7.520 São Carlos; IBH 4.518 and 6.100 São José do Rio Pardo; IBH 922 São Simão; 14.238 Timbira Mcp. Araraquara;

HOGE, A.R. & ROMANO, S.A.L. A new subspecies of *Dipsas indica* from Brazil. [Serpentes, *Colubridae, Dispsadinae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 51-60, 1975.

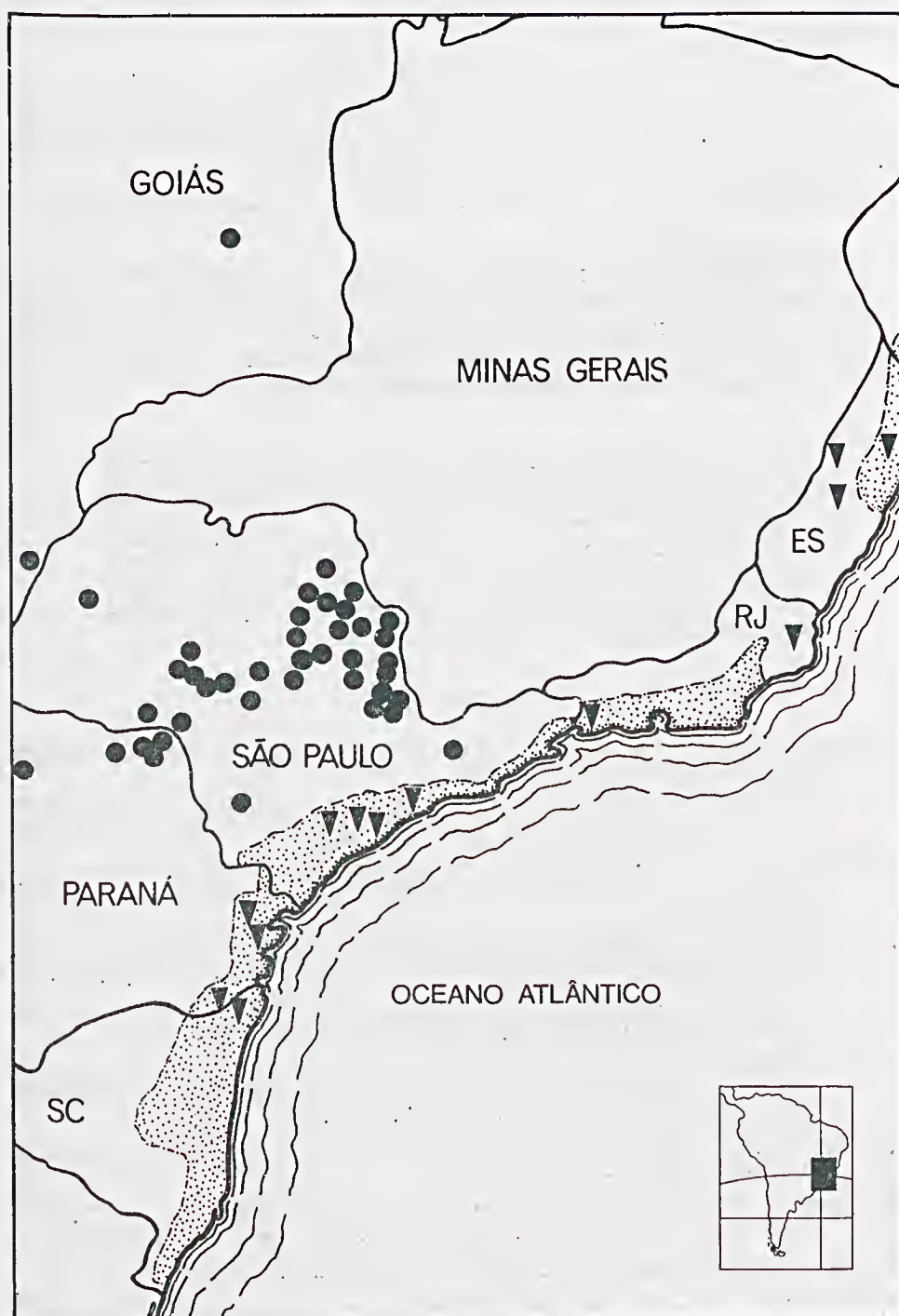



Fig. 15 - *Distribution of:* ● *Dipsas indica bucephala* e ▼ *Dipsas indica petersi*
The stippled area limits the coastal latifoliated forest.

HOGE, A.R. & ROMANO, S.A.L. A new subspecies of *Dipsas indica* from Brazil. [Serpentes, *Colubridae, Dipsadinae*].
Mem. Inst. Butantan, 39: 51-60, 1975.

IBH 2.674 São José do Rio Pardo; IBH 2.721 Tombadouro Mcp Santa Rita do Passa Quatro.

State of Goiás: IBH n.º 9.585 Leopoldo Bulhões.

State of Paraná: IBH 16.877 Andirá; IBH 6.617 Coronel Procópio also n.os IBH 7.372 and 10.263 from same locality; IBH 23.404 Cambará; IBH 9.362 Leoflora Mcp. de Cambará; IBH 10.361 Meireles.

State of Mato Grosso: IBH 22.826; IBH 21.644 and 22.887 Jupiá.

Acknowledgments: We would like to extend our most sincere thanks to the following persons: to the late James A. Peters who permitted acess to the specimens under his care; to Ralph Grantsau for the drawings (Figs. 7 to 14); to João Domingues Cavalheiro for the elaboration of the map (Fig. 15); to Pedro Villela and Joaquim Cavalheiro for scale counts.

RESUMO: Descrição de uma subsp. nov. de *Dipsas indica* do Brasil: *Dipsas indica petersi* subsp. nov. e redescrição de *Dipsas bucephala* (Shaw) 1802.

UNITERMOS: Serpentes; *Dipsadinae. Dipsas indica indica* Laurenti 1768. *Dipsas indica bucephala* (Shaw) 1802. *Dipsas indica cisticeps* (Boettger) 1885. *Dipsas indica ecuadorensis* Peters 1960. *Dipsas indica petersi* subsp. nov.

REFERENCES

1. BOETTGER, O. Liste von Reptilien und Batrachiern aus Paraguai. *Zeitsch. fur Naturwiss, 58:* 213-248, 1885.
2. BOULENGER, G.A. Catalogue of the snakes in the British Museum (Natural History). London, Taylor & Francis, 1896. v. 3. I-XIV: 1-727 + 25 pls.
3. DUMÉRIL, A.M.C.; BIBRON, G. & DUMÉRIL, A. Erpétologie genérale ou histoire naturelle complète des reptiles. Paris, Roret. v. 7. (pls. 1-2): 1-1536.
4. GÜNTHER, A. Catalogue of the colubrine snakes in the collection of the British Museum. London, Taylor & Francis, 1858. I - XVI + 1-281.
5. JAN, G. Elenco sistemático degli ofidi, descritti e designati per l'iconografia generale. Milan, Tipografia Di Lombardi, 1863. I - VII + 1-143.
6. LAURENTI, J.N. Specimen medicum, exhibens synopsis reptilium emendatum cum experimentis circa venena et antidota reptilium austriacorum. Wien, Typ. Joan, Thom. De Trattern, 1768. : 1-214 + 5 pl.
7. OPPEL, M. Suite du 1er Mémoire sur la classification des reptiles. *Ann. Mus. d'Hist. Nat., 16:* 376-395, 1810.
8. PETERS, J.A. The snakes of the subfamily *Dipsadinae. Miscel. Publ. Mus. Zool. Univ. Michigan (114). Ann Arbor* : 1-224 + VIII pls. 1960.
9. SCHINZ, H.R. (*in* Cuvier). *Das Tierreich, 2:* 117, 1822. (non vidi).
10. SHAW, G. General Zoology and systematic natural history. London, G. Kearsley, 1802. 3(2): I - VIII + 313-615.

Recebido para publicação em 02-VI-1975 e aceito em 24-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 61-71, 1975

ARANHAS COLETADAS NAS GRUTAS CALCÁRIAS DE IPORANGA, SÃO PAULO, BRASIL.

VERA REGINA D. VON EICKSTEDT
Seção de Artrópodos Peçonhentos, Instituto Butantan

RESUMO: O presente trabalho refere-se a três espécies de aranha *LABIDOGNATHA* coletadas no interior da gruta Santana (município de Iporanga, São Paulo) durante uma expedição bioespeleológica.

Uma das espécies mencionadas, *Ctenus fasciatus* Mello Leitão 1943 (*CTENIDAE*) era representada até o momento apenas pelo exemplar-tipo. A fêmea desta espécie é recaracterizada e sua genitália ilustrada pela primeira vez. O macho, desconhecido até então, é agora descrito e seus caracteres morfológicos distintivos ilustrados.

É relatada a ocorrência na gruta de espécimes de *Loxosceles adelaida* Gertsch 1967 (*SCYTODIDAE*) e são feitas algumas considerações sobre o status taxonômico desta espécie.

Finalmente, algumas notas são fornecidas sobre uma espécie de THERIDIOSOMATIDAE, a aranha mais comum no interior da gruta.

UNITERMOS: Aranhas cavernícolas do Brasil. *Ctenus fasciatus* Mello Leitão 1943. *Loxosceles adelaida* Gertsch 1967. *Loxosceles similis* Moenkhaus 1898 *THERIDIOSOMATIDAE*.

INTRODUÇÃO

O Centro Excursionista Universitário, fundado em 1970 por alunos da Universidade de São Paulo, tem realizado, periodicamente, expedições bioespeleológicas nas grutas e cavernas calcárias do vale do rio Ribeira de Iguape (São Paulo), na região de Irecê e Morro do Chapéu (Bahia) e no município de São Domingos (Goiás). Tem como objetivo estudar a topografia e a geologia das grutas bem como conhecer a fauna espeleológica, através da coleta sistemática de exemplares cavernícolas.

Endereço para correspondência: Instituto Butantan, Caixa Postal 65, São Paulo, Brasil

EICKSTEDT, V.R.D. von Aranhas coletadas nas grutas calcárias de Iporanga, São Paulo, Brasil.
Mem. Inst. Butantan, 39: 61-71, 1975.

São exíguas e dispersas as referências existentes na literatura especializada sobre aranhas encontradas em grutas no Brasil, o que motivou o interesse do autor em um trabalho conjunto com o C.E.U.

O presente estudo, o primeiro de uma série sobre o assunto, refere-se a três espécies de aranha *LABIDOGNATHA* coletadas durante uma expedição de quinze dias, em janeiro de 1975, no interior da gruta Santana, situada no vale do rio Betari (afluente da margem esquerda do rio Ribeira de Iguape), no município de Iporanga, São Paulo.

MATERIAL E MÉTODOS

Com exceção do material determinado por Mello-Leitão, pertencente ao Museu Nacional do Rio de Janeiro e de um exemplar de *Ctenus fasciatus*, doado ao Instituto Butantan por um habitual fornecedor, todos os outros espécimes que serviram de base à execução deste trabalho foram coletados pelos integrantes do C.E.U. em diversas ocasiões.

Os exemplares foram, em geral, capturados vivos e mantidos dentro de frascos individuais, com tampa de plástico perfurada, contendo um chumaço de algodão embebido em água. As aranhas que morriam durante ou após a coleta eram preservadas em álcool a 75%. Numa etiqueta colada no frasco era anotada a sigla correspondente ao exemplar e, num caderno de registro, relacionavam-se as siglas com os respectivos dados de coleta: nome do coletor, local e data de captura e observações ecológicas.

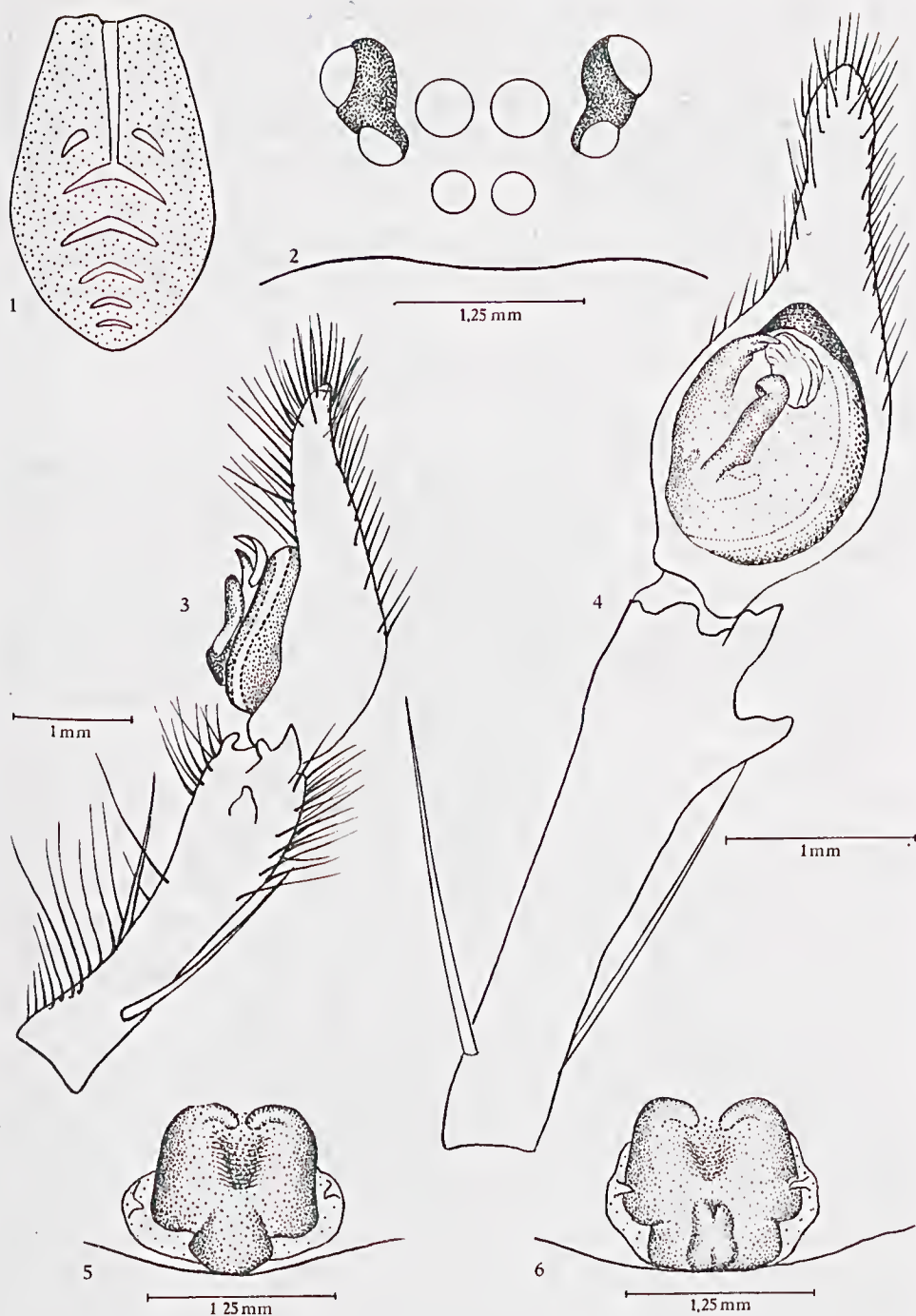
Ao terminar a expedição, o material era trazido ao Instituto Butantan, classificado pelo autor e anexado à coleção aracnológica. Uma relação do material fornecido era, a seguir, entregue ao C.E.U. juntamente com as aranhas em duplicata.

As figuras 1 a 6 e 8 foram desenhadas pelo autor, em câmara clara e passadas a nanquim pela Sra. Delminda Travassos. O desenho da figura 7 foi feito pelo Sr. R.C.H. Grantsau. A região das grutas e cavernas mencionadas no texto é representada, de modo aproximado, em um mapa (Fig. 8).

FAMÍLIA *THERIDIOSOMATIDAE*

Brignoli [3] observou que as aranhas desta família constituem um grupo nitidamente troglófilo nas regiões tropicais, sendo encontradas em grande número no interior de grutas e cavernas. De fato, a espécie mais frequente de aranha no interior da gruta Santana pertence a esta família. São aranhas diminutas (cerca de 2 mm. de corpo), sedentárias, que constroem uma pequena teia orbicular (9-10 cm. de diâmetro) nos espaços entre as estalactites. Suas ootecas, em forma de cubinhos branco-rosados, ficam penduradas, perto das teias, em fios verticais de seda, isoladas ou formando séries de duas a quatro ootecas.

Apesar de bastante comuns na gruta, pouco desses espécimes foram coletados pelos excursionistas. À nossa disposição tivemos, em bom estado de conservação, apenas duas fêmeas adultas, cuja posição genérica permaneceu duvidosa quando seus caracteres morfológicos foram comparados com os dos gê-

EICKSTEDT, V.R.D. von Aranhas coletadas nas grutas calcárias de Iporanga, São Paulo Brasil.
Mem. Inst. Butantan, 39: 61-71, 1975.

Figs. 1 a 6 - *Ctenus fasciatus* - Mello-Leitão 1943: 1 - dorso do abdomem. 2 - disposição ocular. 3 - palpo esquerdc do macho, vista lateral externa. 4 - palpo esquerdo do macho, vista ventral. 5 - epígino do holótipo. 6 - epígino do exemplar 2569A.

neros a que mais se aproximam: *Wendilgarda* Keyserling 1886 (9, pg. 130), *Totua* Keyserling 1891 (10, pg. 261), *Theridiosoma* O. Pickard-Cambridge 1879 (11, pg. 193), *Allototua* Bryant 1945 (4, pg. 410) e *Parogulnius* Archer 1953 (1, pg. 20). Tendo em vista a possibilidade de obtenção de machos em futuras excursões, permitindo uma definição da posição taxonômica da espécie, achamos mais indicado registrar, por ora, apenas a ocorrência, deixando para um trabalho posterior a caracterização.

Material examinado: IB 2749/13206 — uma fêmea com ootecas, Clayton F. Lino (C.E.U.) col. set. 73, gruta Ouro Grosso. IB 2749/15689 - quatro fêmeas e ootecas, Maria Thereza Temperini (C.E.U.) col. jan. 75, gruta Santana.

FAMÍLIA *SCYTODIDAE*

Gênero Loxosceles Heinecken e Lowe

São aranhas sedentárias, de seis olhos, cefalotórax plano, colorido geral castanho amarelado. Constroem teia em lençol, formada por um emaranhado de fios pegajosos de seda. Diversos acidentes graves e mesmo fatais tem sido provocados pela picada de várias espécies de *Loxosceles*.

Essas aranhas são comumente coletadas em expedições bioespeleológicas [3,7]. Segundo Gertsch [7], que estudou a fauna aracneológica das grutas da América Central e México, as *Loxosceles* cavernícolas diferem das achadas do lado de fora apenas por ligeira despigmentação do colorido e devem ser classificadas como troglófilas.

Depois das *THERIDIOSOMATIDAE*, as *Loxosceles* foram as aranhas mais encontradas dentro da gruta Santana. Suas teias irregulares podiam ser vistas, a cada pouco, pelo chão e revestindo as paredes de calcário; presas a elas, foram observadas diversas ootecas, em geral, disfarçadas com grumos de argila e restos de insetos predados pela aranha. Essas *Loxosceles* alimentam-se, principalmente, de pequenos dípteros, existentes, na ocasião, em grande quantidade no interior da gruta. Notou-se que, contrariamente ao usual, as *Loxosceles* praticamente "caçavam" essas moscas, em vez de aguardarem, pacientemente, que elas, inadvertidas, se prendessem aos fios adesivos de sua teia.

A espécie a que pertencem essas *Loxosceles* inclui-se, sem dúvida, no grupo *gaucho*, criado por Gertsch [5] para agrupar um conjunto de espécies sul-americanas relacionadas entre si pelo colorido, proporções corporais e morfologia da genitália. Em geral, é mais fácil reconhecer as espécies de *Loxosceles* pela genitália feminina do que pelo palpo do macho, cuja estrutura é mais ou menos semelhante nas diversas espécies de um mesmo grupo. A genitália das fêmeas capturadas nas grutas é idêntica à ilustrada por Gertsch [5] para *L. adelaida*. Além disso, o tarso do palpo dessas aranhas é dilatado, um caráter encontrado no grupo *gaucho* apenas em fêmeas de *adelaida* (5, pag. 138). No entretanto, as proporções corporais dessas aranhas não coincidem com as obtidas por Gertsch do holótipo de *adelaida*. O macho capturado nas grutas apresenta o tipo básico de genitália das espécies do grupo *gaucho* e proporções corporais mais próximas às do tipo de *similis*.

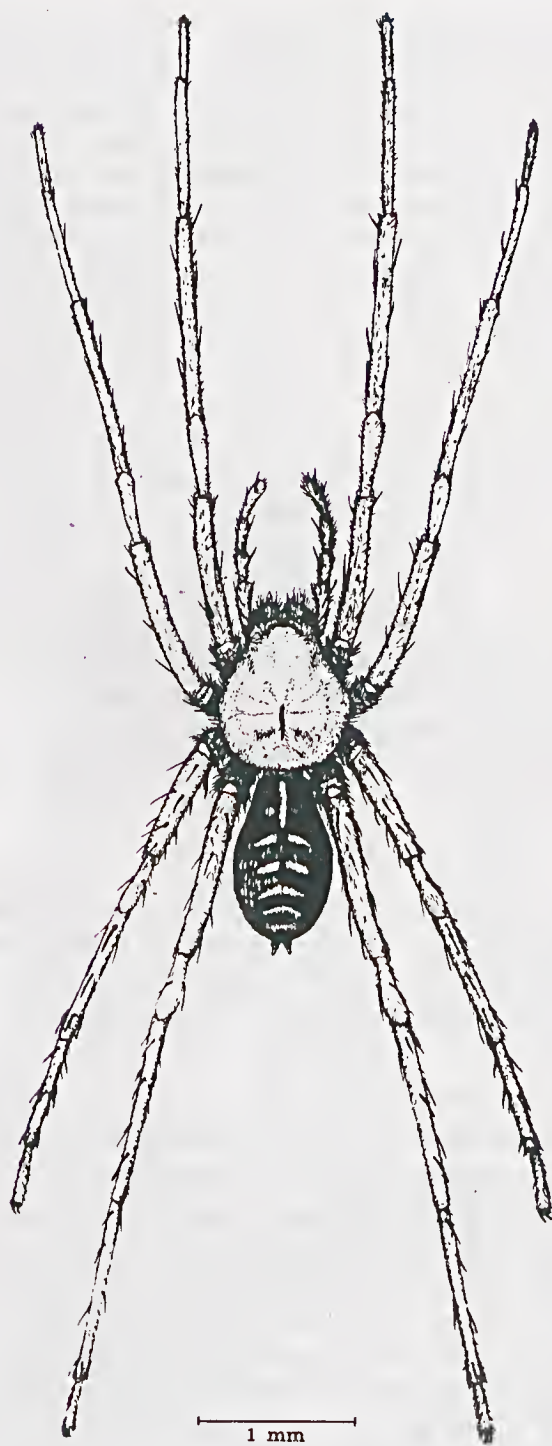



Fig. 7 - *Ctenus fasciatus* Mello-Leitão 1943. Vista dorsal, fêmea.

Brignoli[3] examinou um macho, 4 fêmeas e 12 jovens de *Loxosceles*, coletados na gruta das Areias (situada também no vale do rio Betari) que são, com certeza, co-específicos aos ora em estudo, e os identificou como *L. adelaida*. Segundo êste autor, o macho de *L. adelaida*, que êle descreveu, é muito semelhante ao de *similis* e *variegata* Simon 1907 mas pode ser distinguido deles graças ao êmbolo, que é quase reto em *adelaida*. Assim, de acordo com o estabelecido até o momento para as espécies do grupo *gaucho*, as *Loxosceles* coletadas nas grutas de Iporanga devem ser determinadas como *L. adelaida*, tendo em vista, principalmente, a morfologia da genitália feminina. No entretanto, a meu ver, muitos indícios existem sugerindo que *L. adelaida* Gertsch 1967 seja a fêmea de *L. similis* Moenkhaus 1898 e que as aranhas até agora referidas como fêmeas de *similis* sejam, na verdade, pertencentes à espécie *surata* Simon 1907 que, neste caso, não seria sinônima de *similis*, como tem sido considerada.

Material examinado: IB 2571 — 3 jovens, Clayton F. Lino (C.E.U.) col. jul. 72, gruta Santana. IB 2751/14226 — 1 fêmea, C.E.U. col. abr. 74, gruta Morro Preto. IB 666/15689 — 1 macho, 1 fêmea e 2 jovens, Maria Thereza Temperini (C.E.U.) col. jan. 75, gruta Santana.

Dimensões da fêmea: IB 2751/14226: Compr. cefal. — 3,5 mm. Fêmur I-6,5 mm. Compr. relativo das pernas: 2 4 1 3 (25,6 : 23,2 : 22,5 : 19,6). Compr. fêmur I/compr. cefal. — 1,8. Compr. perna I/compr. cefal. — 6,4. Dimensões do macho: IB 666/15689 — Compr. cefal — 3,0 mm. Fêmur I-7,0 mm. Compr. relativo das pernas 2 4 1 3 (33,5 : 26,0 : 25,5 : 22,5). Compr. fêmur I/compr. cefal. — 2,3 Compr. perna I/compr. cefal. — 8,5.

FAMÍLIA *CTENIDAE*

Os ctenídeos constituem uma família de aproximadamente 400 espécies tropicais e subtropicais. São aranhas errantes, de hábitos noturnos. Segundo Gertsch[6], tem sido registradas com frequência em cavernas, onde costumam ser encontradas, a plena vista, andando pelo chão e paredes.

Ctenus fasciatus Mello-Leitão 1943

Desta espécie era conhecido, até o momento, apenas o exemplar-tipo, uma fêmea procedente de Iporanga (N.º 58152, Museu Nacional do Rio de Janeiro).

A sistemática das *Ctenus* encontra-se ainda bastante precária devido, em parte, a ocorrências deste tipo. Embora sejam bastante comuns e existam centenas de referências a espécies desse gênero, muitas das aproximadamente 120 espécies neotropicais citadas na literatura foram descritas baseadas em um único exemplar (várias vezes em filhotes, na maioria em fêmeas) e diversas delas não mais foram coletadas ou estudadas posteriormente. Assim, como bem observou Bonnet (2, pg. 45), "malgré ses 234 espèces, ce genre *Ctenus* est loin d'être bien assis...". A situação agrava-se ainda mais quando as descrições originais são insuficientes para caracterizar a espécie.

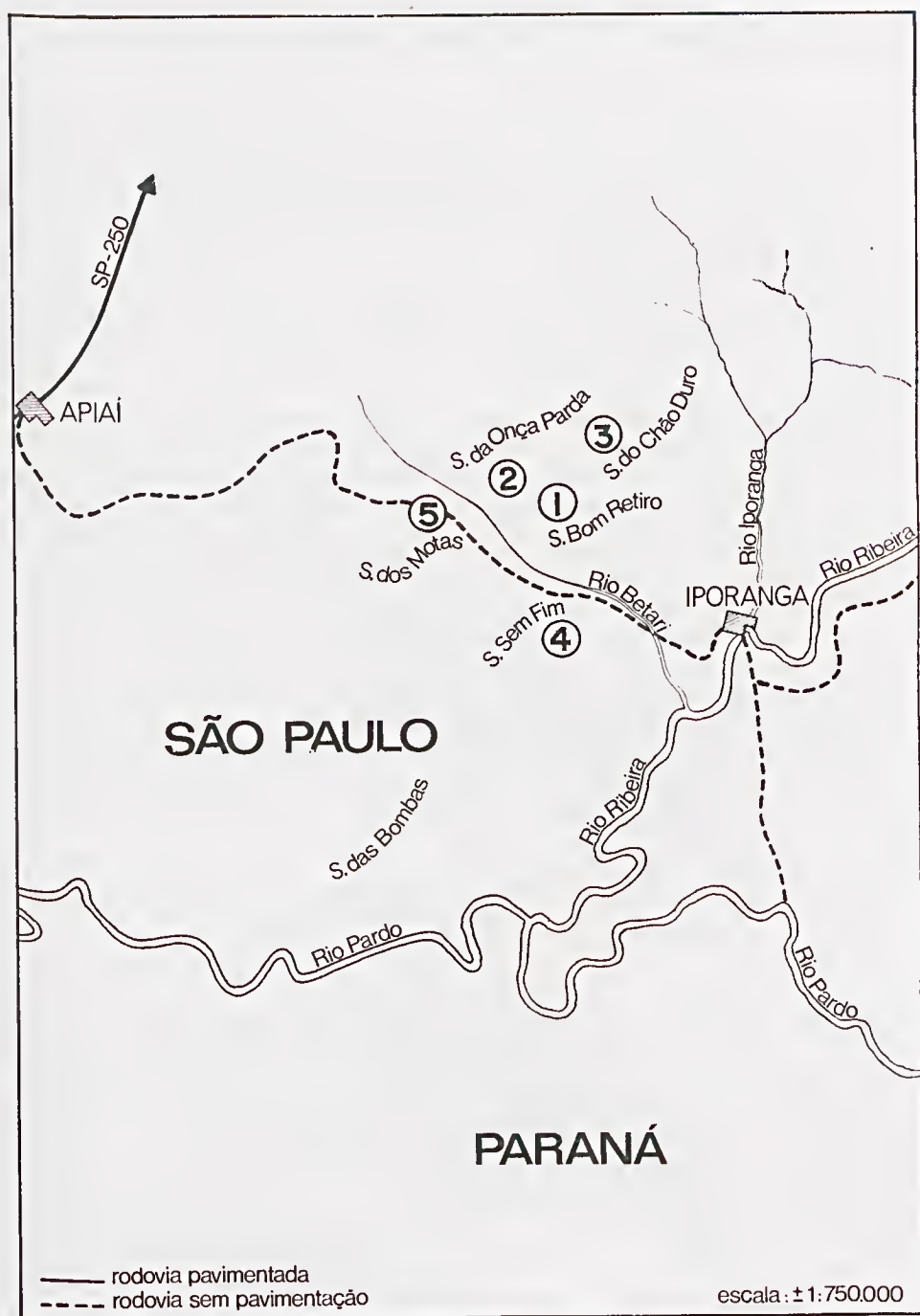



Fig. 8 - Mapa da região das grutas e cavernas calcárias do vale do rio Betari, Iporanga, mencionadas no texto (baseado na fig. 15 do item bibliográfico 12): 1 - caverna Alambari. 2 - gruta Morro Preto. 3 - gruta Ouro Grosso. 4 - gruta da Água Quente. 5 - gruta Santana.

EICKSTEDT, V.R.D. von Aranhas coletadas nas grutas calcárias de Iporanga, São Paulo, Brasil.
Mem. Inst. Butantan, 39: 61-71, 1975.

O estudo do exemplar-tipo de *Ctenus fasciatus* e do material coletado pelo C.E.U. nos permitiu fornecer novos dados para o reconhecimento dessa espécie.

Diagnose: Espécie pouco pilosa, de colorido geral castanho-avermelhado no dorso e amarelo pálido na região ventral. Abdome acinzentado, com uma série de linhas claras em forma de telhado na face dorsal (Fig. 1). Pernas 1 4 2 3 (macho) e 4 1 2 3 (fêmea), longas e finas. Genitália masculina e feminina como nas figuras 3 a 6.

Etiomologia: *Ctenus fasciatus* = *Ctenus* cingido por faixas. O nome específico refere-se ao desenho típico encontrado no abdome de macho, fêmea e filhotes da espécie.

Descrição da fêmea: Quando Mello-Leitão descreveu a fêmea [10] não fêz nenhuma referência à sua genitália, fazendo supor tratar-se de um exemplar imaturo. O exame do holótipo, porém, mostrou tratar-se de uma fêmea adulta, cujo epígino é representado na Fig. 5. Algumas das estruturas morfológicas, citadas por Mello-Leitão, seriam, a meu ver, melhor caracterizadas como segue: olhos laterais posteriores (O.L.P.) e medianos posteriores (O.M.P.) do mesmo tamanho; O.M.P. separados entre si por cerca de um raio e dos laterais posteriores (O.L.P.) por pouco mais que um diâmetro. O.L.A. alongados, seu maior diâmetro igual ao diâmetro dos medianos anteriores. O.L.A. separados dos M.A. por um diâmetro dos M.A. Área ocular mediana tão larga quanto longa, mais estreita na frente. O.L.A. e O.L.P. em cômoros isolados. Altura do clípeo igual ao diâmetro dos M.A. Sulco ungueal com 4 dentes grandes e um muito pequeno na margem inferior (retromargem). Tíbia I com 5 pares de espinhos ventrais, 1 lateral interno, 1 lateral externo e nenhum dorsal.

Descrição do macho: - IB 2740/15689A

Dimensões: Compr. do corpo: 16,5 mm. Envergadura total 137 mm. Cefal.: 8,3 mm. compr. e 6,5 mm larg. Tíbia do palpo: 3,2 mm. compr. e 0,6 mm. larg.

Perna	Fêmur	Pa+Ti	Metatarso	Tarso	Total
I	16,5	24,0	19,0	6,5	66,0
II	15,5	21,0	16,5	5,5	58,5
III	13,0	16,5	13,5	5,0	48,0
IV	16,0	19,5	19,5	5,5	60,5

Colorido: Cefalotórax, palpos e pernas castanho avermelhado no dorso. Tíbia, metatarso e tarso das pernas castanho mais escuro. Face dorsal dos fêmures com pelos escuros, formando manchas irregulares. Quelíceras castanho avermelhado escuro, cobertas por pelos acinzentados. Esterno, face ventral das coxas e fê-

mures das pernas, castanho amarelado; dos demais artículos, castanho avermelhado. Lábio e maxilas castanho avermelhado. Dorso do abdome cinza escuro com uma linha longitudinal clara desde a base até quase a metade do dorso, seguida de 4-5 linhas claras em forma de V aberto, invertido (Fig. 1).

Estrutura: Área ocular mediana tão larga quanto longa, ligeiramente mais estreita na frente. O.M.A. um pouco menores que os O.M.P. Segunda fila de olhos procurva pelas margens anteriores. Clípeo igual ao diâmetro dos O.M.A. (Fig. 2). Sulco ungueal das quelíceras com 4 dentes grandes, seguidos de 1 ou 2 dentículos punctiformes na margem inferior (retromargem); promargem com 3 dentes, o segundo maior que os outros dois. Lábio mais longo que largo (2,4 mm. compr. e 2,0 mm. larg. atingindo a metade das lâminas maxilares, mas não o têrço apical. Pernas 1 4 2 3. Tíbia I com 5 pares de espinhos ventrais, 1 lateral interno, 2 laterais externos e 1-2 dorsais. Metatarso 4 reto. Garras tarsais com 3-4 dentes conspícuos e outros muito pequenos em direção à base. Palpo (figs. 3 e 4): Tíbia 5 vezes mais longa que larga, com uma apófise lateral externa no terço distal e uma apófise apical, recortada na margem anterior. Artículos do palpo sem escópula veludosa de pelos na face lateral interna.

Material examinado: N.º 58152 Museu Nacional R. Janeiro (holótipo), femea, Oton Leonardos col. Iporanga, S. Paulo. IB 2451/7598 — 1 fêmea, C.E.U. col. jul. 71, vale rio Betari, município de Iporanga. IB 2451/7880 1 fêmea, Josias Jacobsen col. set. 71, município de Guapiara, S. Paulo. IB 2536/8909A — 1 jovem, C.E.U. col. fev. 72, Abismo dos Caramujos, vale rio Betari. IB 2536/8909B — 1 jovem, C.E.U. col. fev. 72, entrada da caverna Alambari de Baixo. IB 2569 — 2 fêmeas e 1 jovem, C.E.U. col. jul. 72, Caverna Ouro Grosso. IB 1976 — 1 fêmea e 1 jovem, C.E.U. col. jan. 73, Gruta das Figueiras, vale rio Betari. IB 2690/13206 — 1 fêmea com ootecas e filhotes recém-nascidos, Clayton F. Lino(C.E.U.) col. set. 73, Gruta Ouro Grosso. IB 2690/13638A — 1 jovem, Martin Christoffersen (C.E.U.) col. jan. 74, Gruta da Água Quente, vale rio Betari. IB 2690/13638B — 1 jovem, Martin Christoffersen col. jan. 74, Caverna Alambari de Baixo. IB 1393/14226 — 1 fêmea, (C.E.U.) col. mar. 74, Abismo das Ossadas, região da Serra da Onça Parda. IB 2740/15689 — 2 machos e 2 jovens, Maria Thereza Temperini (C.E.U.) col. jan. 75, gruta Santana.

Entre os tipos de *Ctenus* do Museu Nacional do Rio de Janeiro que me foram emprestados para estudo encontrei um exemplar sem número, acompanhado de uma etiqueta manuscrita por Mello-Leitão, onde se lê: "*Ctenus quadrilineatus* typus, Gruta Itaperussu, dez. 46, Dr. Curial". Nos registros do Museu Nacional, conforme informações da Dra. Anna Timotheo da Costa, nada consta além dos dados mencionados na etiqueta e na literatura não encontrei citação dessa espécie. O exame do exemplar mostrou tratar-se de uma fêmea semi-adulta de *Ctenus fasciatus*. A gruta Itaperuçu é uma gruta calcária situada no município de Rio Branco do Sul, a 25 quilômetros de Curitiba, Paraná.

Distribuição geográfica: São Paulo: Iporanga (arredores e interior de grutas calcárias) e Guapiara. Paraná: Rio Branco do Sul (gruta Itaperuçu).

Dados biológicos: Estas aranhas foram, geralmente, encontradas andando pelas paredes de calcário próximas à entrada das grutas mencionadas. Um dos exem-

plares (IB 2740/15689B) foi coletado no interior da gruta Santana a uma distância aproximada de 260 metros em linha reta da entrada da gruta. Uma fêmea semi-adulta (IB 2690/13638) apresentava um verme parasitando seu abdome.

CONCLUSÕES

Nenhuma das três espécies capturadas no interior das grutas de Iporanga é cavernícola obrigatória (troglóbia): a não ser por uma ligeira despigmentação do colorido e um certo alongamento das pernas, não mostram nenhuma adaptação especial à vida cavernícola. Conforme a terminologia bioespeleológica, essas aranhas devem ser classificadas como troglófilas.

De maneira geral a presença de aranhas no interior da Gruta Santana foi constatada até uma distância de aproximadamente 260 m. da entrada, tanto na galeria do rio Roncador (que corre dentro da gruta) como também nas galerias superiores, situadas a mais ou menos 15 m. acima.

É interessante observar a ausência de caranguejeiras nas diversas grutas até agora exploradas pelo C.E.U. Em outras grutas da região tropical elas tem sido normalmente encontradas [3].

Os nossos dados confirmam a observação de Brignoli [3] de que na fauna araneológica cavernícola do Brasil predominam *THERIDIOSOMATIDAE* e *SCYTODIDAE*, seguidas por outros grupos menos frequentes.

Agradecimentos: Este trabalho não teria sido possível sem a colaboração dos integrantes do C.E.U. A eles e, em especial, a Maria Thereza Temperini, que dedicou particular interesse à coleta e observação das aranhas cavernícolas, os meus agradecimentos. À Dra. Anna Timotheo da Costa, do Museu Nacional do Rio de Janeiro, que gentilmente emprestou-me os tipos de *Ctenus* sob sua responsabilidade, o meu agradecimento.

ABSTRACT: This paper deals with three cave-dwelling species of spiders collected in a large limestone cave (Gruta Santana) near Iporanga, São Paulo, Brazil, during a fifteen-day biespeleological expedition.

One of the species, *Ctenus fasciatus* Mello-Leitão 1943 (*LABIDOGNATHA*; *CTENIDAE*) was known so far only from the original description. The female is recharacterized and genitalia illustrated for the first time. The male, so far unknown, is described.

Specimens of *Loxosceles* (*LABIDOGNATHA*; *SCYTODIDAE*) collected during the expedition are mentioned, and remarks are made about their identification, which is still provisional.

Some notes are given on a species of *THERIDIOSOMATIDAE*, the commonest spider in the caves explored.

UNITERMS: Brazilian cave-dwelling spiders. *Ctenus fasciatus* Mello Leitão 1943. *Loxosceles adelaida* Gertsch 1967. *Loxosceles similis* Moenkhaus 1898. *THERIDIOSOMATIDAE.*

EICKSTEDT, V.R.D. von Aranhas coletadas nas grutas calcárias de Iporanga, São Paulo, Brasil.
Mem. Inst. Butantan, 39: 61-71, 1975.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARCHER, A.F. Studies in the orbweaving spiders *(Argiopidae). Amer. Mus. Novit.*, (1622): 1-27, figs. 1-46, 1953.

2. BONNET, P. *Bibliographia Araneorum.* Toulouse, Douladoure Impr., 1961, v. 3, 591 p.

3. BRIGNOLI, P.M. Sur quelques araignées cavernicoles d'Argentine, Uruguay, Brésil et Venezuela récoltées par le Dr. P. Strinati, *Rev. suisse Zool., 79* (1): 361-385, 1972.

4. BRYANT, E.B. The *Argiopidae* of Hispaniola. *Bull. Mus. Comp. Zool, 95* (4): 357-418, pls. 1-4, 1945.

5. GERTSCH, W.J. The spider genus *Loxosceles* in South America *(Araneae; Scytodidae). Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 136* (3): 117-174, pls. 3-11, 1967.

6. GERTSCH, W.J. A report on some Mexican cave spiders. *Bull. Assoc. Mex. Cave Studies*, (4): 47-111, 1971.

7. GERTSCH, W.J. A report on cave spiders from Mexico and Central America. *Bull. Assoc. Mex. Cave Studies*, (5): 141-163, 1973.

8. KEYSERLING, E. *Die Spinnen Amerikas. Theridiidae.* Nünberg, Bauer & Raspe, 1886. v. 2, par. 2, 295 p., 11 pls.

9. KEYSERLING, E. *Die Spinne Amerikas. Brasilianische Spinnen.* Nürnberg, Bauer & Raspe, 1891. v. 3, 278 p., 10 pls.

10. MELLO-LEITÃO, C.F. Araneologica Varia Brasiliana. *An. Acad. Bras. Ci., 15* (3): 255-265, 1943.

11. PICKARD-CAMBRIDGE, O. On some new and rare British spiders, with characters of a new genus. *Ann. Mag. Nat. Hist., 4* (5): 190-215, pl. XII, 1879.

12. SÃO PAULO. Secretaria de Economia e Planejamento. Superintendência do Desenvolvimento do Litoral Paulista. *Possibilidades turísticas no vale do Ribeira e litoral sul.* São Paulo, [1971/74].

Recebido para publicação em 09-VI-1975 e aceito em 24-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 73-77, 1975

ÁCAROS PILÍCOLAS DO BRASIL (ACARINA: LISTROPHORIDAE)

NÉLIDA M. LIZASO
Divisão de Biologia, Instituto Butantan

RESUMO: O gênero *Prolistrophorus* Fain, 1970 inclui doze espécies, todas da região neotropical. No presente trabalho é descrita uma espécie nova: *Prolistrophorus dolichus* parasitando "rato" capturado no Instituto Butantan, São Paulo.

UNITERMOS: *Prolistrophorus* Fain, 1970 (Acarina: Listrophoridae). *Prolistrophorus dolichus* sp.n.

INTRODUÇÃO

O gênero *Prolistrophorus* foi caracterizado por Fain em 1970 para incluir duas espécies descritas anteriormente por Hirst, 1921 em *Listrophorus* e mais seis espécies novas. Em 1973, Fain acrescentou mais quatro espécies à esse gênero, portanto o total de espécies de *Prolistrophorus* atualmente é de 12. Todas as espécies são da região neotropical, assim distribuidas: Suriname (2), Perú (1), Brasil (3), Paraguai (1), Argentina (5).

No presente trabalho é descrita uma espécie nova: *Prolistrophorus dolichus,* sp.n. coletados em "rato" por Flávio da Fonseca, em 12-III-1934, no Instituto Butantan.

Prolistrophorus dolichus, sp.n.

Macho (Figs. 2, 3, 4)

Corpo comprimido lateralmente. Dimensões: 440 μ de comprimento. Largura máxima ao nível da placa propodosomal de 112 μ. Apresenta uma região segmentada (5 aneis) entre as placas propodosomal e opistosomal; pernas bem desenvolvidas.

Face dorsal: distinguem-se 3 placas: uma que recobre o capitulum seguindo-se sem intervalo pela placa propodosomal, que está separada da opistosomal por

Endereço para correspondência: Caixa postal 65 - São Paulo - Brasil.

5 aneis, que lhe dão aspecto de sanfona, onde se implantam 2 pares de cerdas. A placa que recobre o capítulum é pontilhada. Placa propodosomal, de aspecto semelhante à anterior, com 2 pares de cerdas. Placa opistosomal lisa, recobrindo o dorso até a extremidade posterior, com 1 par de cerdas pequenas na região posterior.

Face ventral: as placas propodosomal e opistosomal se continuam pela face ventral até quase unir-se na linha média. Fica assim uma faixa média sem quitinizar onde se implantam: 1 par de cerdas pequenas entre as coxas I e II, 1 par antes da coxa III, 1 par anterior e outro posterior da coxa IV. Região genital ao nível posterior da coxa III. Poro anal por detrás do sulco anal. Extremidade posterior do corpo bilobulada, apresentando 1 par de cerdas longas e 2 pares de cerdas pequenas, e 1 par de cerdas em posição lateral.

Pernas: os tarsos I e II apresentam 1 par de cerdas longas, sendo as do tarso II voltadas para trás; apresentam também 3 pares de cerdas menores. Tarsos III e IV com cerdas pequenas.

Fêmea (Fig. 1)

Corpo: mede 510 μ por 105 μ.
Face dorsal: o capítulum semelhante ao do ♂. Escudo propodosomal esculturado, apresentando uma zona médio-dorsal diferenciada. Nele implantam-se 3 pares de cerdas. Por detrás do escudo, o corpo apresenta-se segmentado (com aspecto de sanfona) até o seu terço posterior, com dois pares de cerdas. No terço posterior do corpo, de aspecto liso, implantam-se 3 pares de cerdas.
Face ventral: a região médio anterior semelhante ao ♂. Ao nível da coxa III acha-se o orifício genital, e na extremidade posterior do corpo, o orifício anal e 1 par de cerdas.

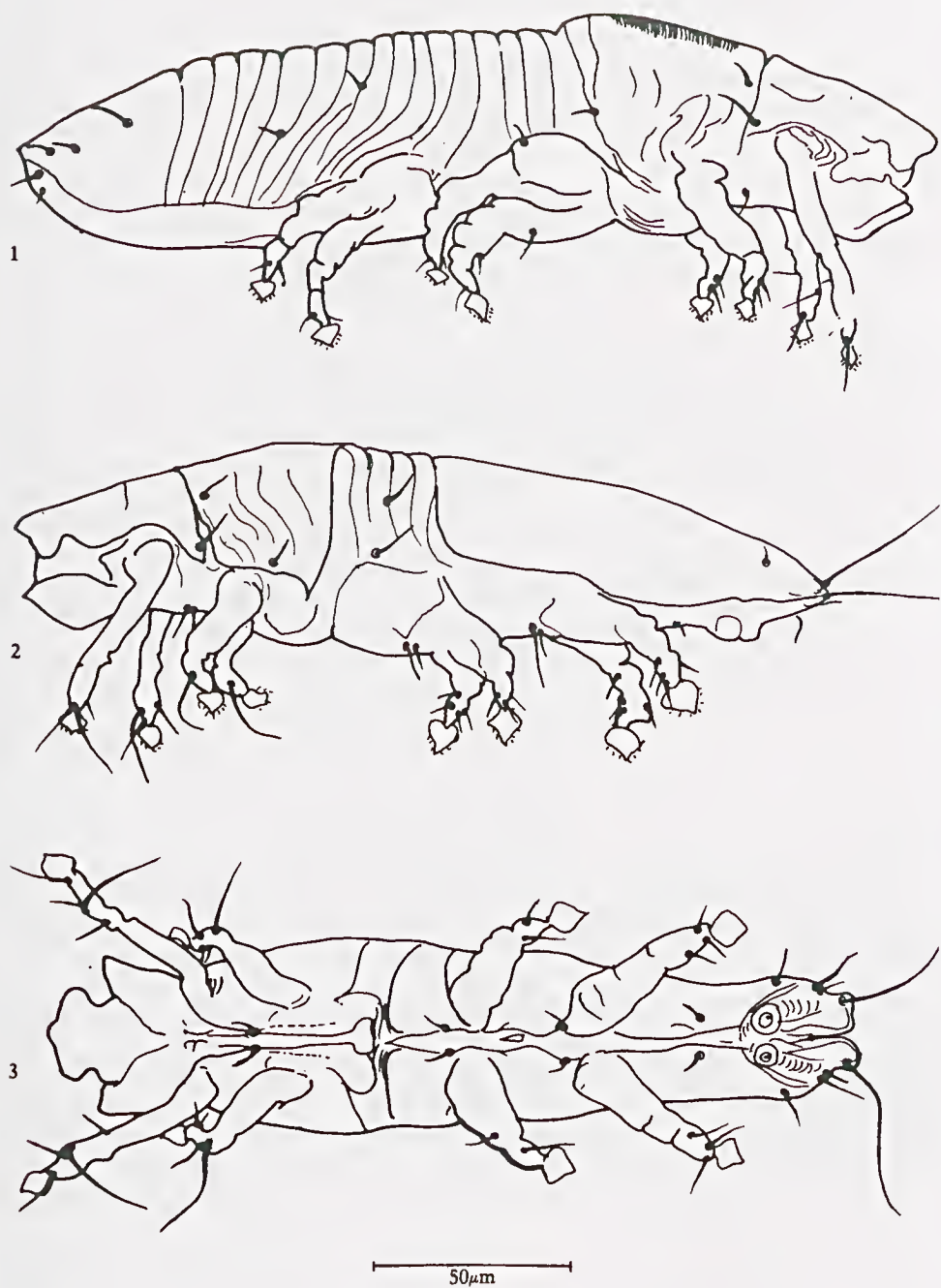
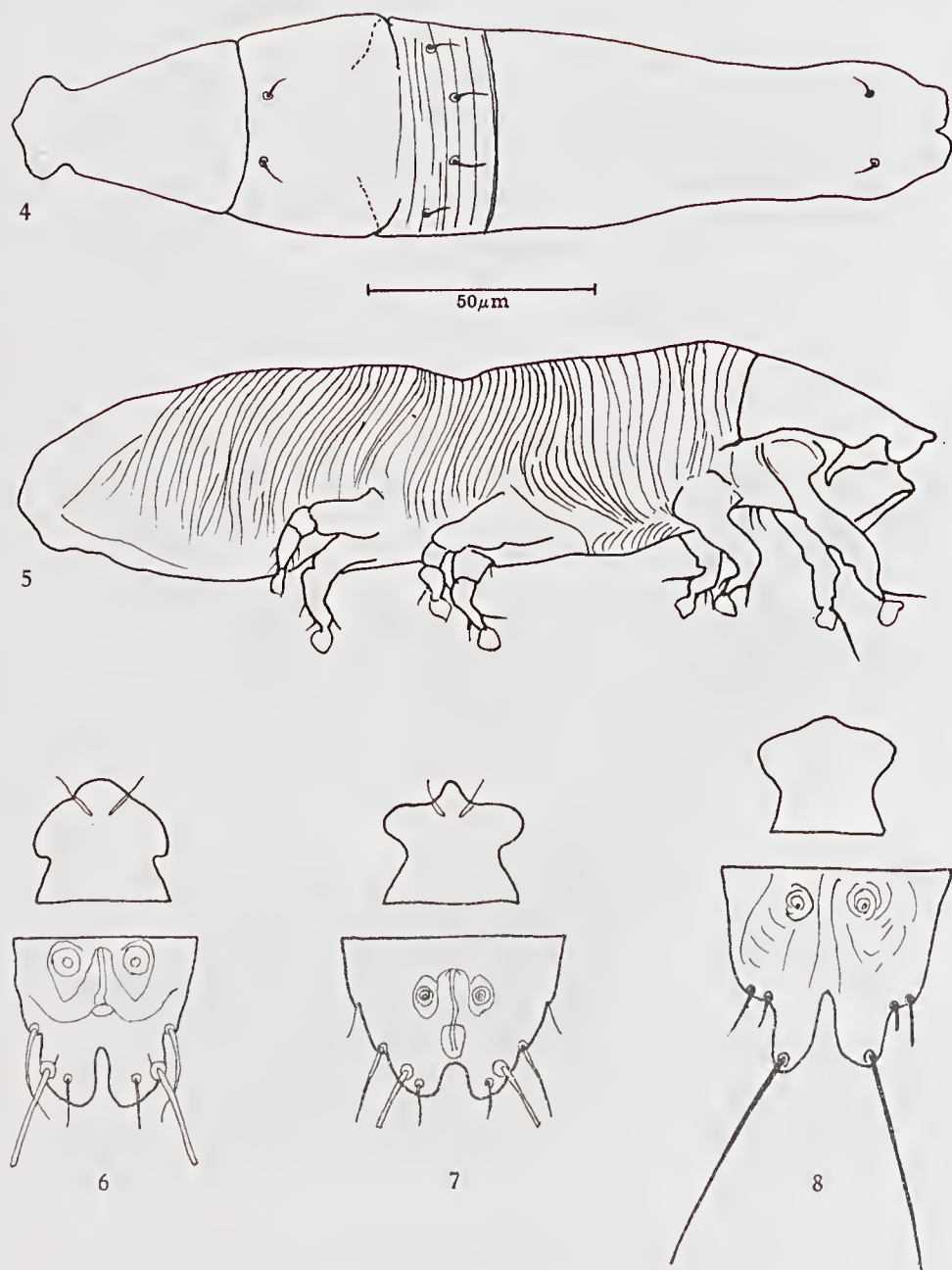
Pernas: as pernas I e II semelhantes às do ♂. Pernas III e IV menos desenvolvidas que nos ♂, com cerdas pequenas.

Ninfa (Fig. 5)

De aspecto semelhante ao adulto mede 420 μ de comprimento.
Face dorsal: apresenta somente a placa do capítulum, vendo-se em continuação o corpo uniformemente segmentado (de aspecto semelhante ao da fêmea adulta).
Face ventral: semelhante à fêmea adulta, orifício genital indistinto.
Pernas: semelhante às do adulto.

Holótipo macho coletado parasitando "rato" procedente do Instituto Butantan, São Paulo, em 12-III-34, depositado sob o n.º 260 da Coleção Flávio da Fonseca, do Instituto Butantan. Montados na mesma lâmina parátipos em um total de 7 ♀, 18 ♂ e 1 ninfa. Outro lote com as mesmas características de hospedeiro e localidade de procedência com 7 ♂ e 8 ♀.

DISCUSSÃO TAXONÔMICA

Prolistrophorus dolichus diferencia-se de *Prolistrophorus frontalis* (Hirst, 1921) por não possuir projeção anterior no escudo do capítulum, caráter este que o aproxima de *P. argentinus* (Hirst, 1921), mas do qual se diferencia pela forma geral do escudo do capítulum, especialmente a projeção lateral.

Figs. 1 a 3 - *Prolistrophorus dolichus* sp. n.: 1 - fêmea, vista lateral. 2 - macho, vista lateral. 3 - macho, vista ventral.

Figs. 4 e 5 - *Prolistrophorus dolichus* sp. n.: 4 - macho, vista dorsal. 5 - ninfa, vista lateral.
Figs. 6 a 8 - Detalhes das regiões anterior e posterior de 3 espécies de *Prolistrophorus*: 6 - *P. argentinus* (Hirst, 1921). 7 - *P. frontalis* (Hirst, 1921). 8 - *P. dolichus* sp. n.

Considerando a região posterior do corpo, em *Prolistrophorus dolichus*, sp.n. os pelos se implantam, na seguinte ordem, a partir da linha média do corpo: 1 longo, 1 pequeno, 1 médio; em *P. frontalis* (Hirst) são: 1, pequeno, 1 longo, 1 médio, igual que em *P. argentinus* (Hirst). (Figs. 6 a 8)

Das espécies descritas por Fain em 1970 e 1973, a descrição é muito sumária e não existem desenhos publicados, para podermos comparar. Não tivemos oportunidade de examinar os exemplares tipos, para poder precisar mais nítidamente as semelhanças e diferenças.

O ♂ de *P. dolichus* diferencia-se do de P. *cryptophallus* Fain, por não apresentar arco esclerozado muito largo e espesso em forma de U envolvendo o pênis, e pelo aspecto do escudo pos-capitular que em *dolichus* é pontilhado e em *cryptophallus* tem aspecto de pseudo escamas.

Diferencia-se do ♂ de *P. striatus* pelo escudo opistosomal, que nesta espécie se apresenta com estrias transversais na sua quase totalidade, e em *dolichus* é liso, único, entretanto que em *hirstianus* há 2 escudos separados na linha média do corpo.

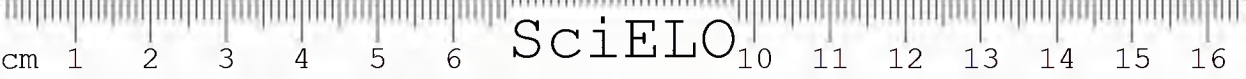
P. nectomys apresenta as ventosas adanais de forma triangular, e *dolichus*, arredondadas.

ABSTRACT: Twelve species are considered in the genus *Prolistrophorus* Fain, 1970, all of them from the Neotropical region. In the present paper one new species is described: *Prolistrophorus dolichus*, sp.n. from "rat" of Instituto Butantan, São Paulo.
UNITERMS: *Prolistrophorus* Fain, 1970 (Acarina: Listrophoridae). *Prolistrophorus dolichus* sp.n.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FAIN, A. Diagnoses de noveaux Lobalgides et Listrophorides (Acarina: Sarcoptiformes). *Rev. Zool. Bot. Afr., 81* (3/4): 271-300, 1970.
2. FAIN, A. Diagnoses d'Acariens nouveaux (Listrophorides et Myobiidae). *Rev. Zool. Bot. Afr., 87*(2): 330-332, 1973.
3. HIRST, S. On some new or little-known Acari mostly Parasitic in habit. *Proc. Zool. Soc. Lond., 25*: 357-378, 1921.
4. Mc DANIEL, B. The subfamily Listrophorinae Gunther with a description of a new species of the genus *Listrophorus* Pagenstecher from Texas (Acarina: Listrophoridae). *Acarologia, 7* (4): 704-712, 1965.
5. Mc DANIEL, B. The Superfamily Listrophoroidea and the stablishment of some new families (Listrophoroidea, Acarina). *Acarologia, 10* (3): 477-482, 1968.

Recebido para publicação em 30-III-1975 e aceito em 27-X-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 79-83, 1975

SOBRE UMA HEMOGREGARINA E UM TRIPANOSSOMO DE PEIXE DE MAR DE SÃO PAULO (BRASIL). *

SAMUEL B. PESSÔA e PERSIO DE BIASI
Secção de Venenos, Instituto Butantan

RESUMO: Os autores, após terem estudado o sangue de algumas espécies de peixes marinhos por eles coletados nas costas de São Sebastião (Norte de São Paulo), descreveram uma hemogregarina (*Haemogregarina moringa* n. sp.) no sangue de uma moréia *(Gymnothorax moringa)* e um tripanossomo (*Trypanosoma radiale* n. sp.) no sangue de um michole *(Diplectrum radiale).*
UNITERMOS: Peixe. *Haemogregarina. Trypanosoma.* Hemoparasitas.

INTRODUÇÃO

No ano passado, em outubro de 1974, aproveitamos uns dias de férias que passamos em São Sebastião (Litoral Norte do Estado de São Paulo), para examinar o sangue de alguns peixes pescados, por nós mesmos, no mar que banha as costas daquela localidade. Aqui relatamos o encontro de hemoparasitas em duas espécies de peixes do mar da localidade em apreço.

MÉTODOS

Os peixes, uma vez fisgados com anzol, eram colocados em um recipiente com água do mar e levados com vida até nossa casa, onde o seu sangue era extraído e espalhado em lâminas de microscopia. Para isso fazíamos um corte com tesoura pelas branquias expondo o coração que era puncionado com uma seringa armada de agulha para injeção ou, mais frequentemente, com pipeta de Pasteur. Retirado o sangue, espalhávamos uma gota em lâminas de microscopia e fazíamos um esfregaço fino que era imediatamente secado. O sangue colhido e seco era fixado pelo alcool metílico e corado pelo Giemsa. De cada espécime de peixe fazíamos em média 4 a 6 lâminas e assim colhemos cêrca de 150 lâminas com o sangue dos exemplares de peixes pescados.

---

* Trabalho executado com auxílio do Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan.
Endereço para correspondência: Caixa postal, 65 - São Paulo - Brasil.

PESSÔA, S.B. & BIASI, P. Sobre uma hemogregarina e um tripanossomo de peixe de mar de São Paulo (Brasil).
Mem. Inst. Butantan, 39: 79-83, 1975.

HEMOPARASITAS

Encontramos unicamente uma hemogregarina no sangue de uma moréia e um tripanossomo no sangue de um michole.

Trypanosoma: Encontramos um único paixe parasitado por tripanossomo. Trata-se de um exemplar do peixe vulgarmente denominado michole. Este peixe, *Diplectrum radiale* (Quoy & Gaimard, 1824), pertencente à família Serranidae, é muito frequente nas costas norte de São Paulo. De 8 especimens examinados, só encontramos um único parasitado por tripanossomo (Figs. 1 e 2). O flagelado que era muito raro no sangue do peixe, pois achamos um único parasita nas lâminas examinadas, media 27,5 microns de comprimento e 4,7 microns de largura, na sua porção mais larga; cinetoplasto situado a 10 microns da extremidade posterior; o flagelo corre ao longo de uma membrana ondulante estreita e torna-se livre na extremidade anterior do organismo, sendo esta porção quase imperceptível na nossa preparação. O núcleo alongado, situado no meio do corpo do animal, mede 4 microns de comprimento. A este tripanossomo, que consideramos uma espécie nova, propomos o nome de *Trypanosoma radiale* n. sp.

Haemogregarina: Examinamos 4 exemplares da moréia mas somente um revelou algumas hemogregarinas no sangue.

A moréia, como se sabe, pertence à família *Muraenidae;* parece-nos que há várias espécies de moréias, classificadas no gênero *Gymnothorax*. Só pescamos uma espécie que tem o corpo pontilhado de escuro, denominada pelos pescadores locais "moréia pintada", identificada como *Gymnothorax moringa* (Cuvier). Segundo Halstead e Courville [3], a distribuição geográfica deste peixe vai do golfo do México ao Brasil. Como possui um corpo alongado e é um peixe agressivo, os pescadores de São Sebastião também o chamam de serpente do mar.

Foi Carini [2] quem em 1933 descreveu, pela primeira vez um hemoparasita de peixe do mar do Brasil, uma hemogregarina da tainha (*Mugil brasiliensis*). Não encontramos depois deste trabalho pioneiro, nenhum outro sobre hemoparasitas de peixes marinhos brasileiros, ao contrário do que ocorre com peixes de água doce, cujos trabalhos são em maior número.

A hemogregarina que encontramos na moréia apresenta-se sob a forma de um crescente, medindo cerca de seis microns de comprimento, colocada obliquamente dentro da hemácia; possui núcleo arredondado, bem visível, medindo cerca de dois microns de diâmetro (Figs. 3 e 4). Alguns outros glóbulos também se mostraram parasitados por formas da hemogregagrina (Fig. 5), que nos parecem ser esquizontes jovens.

A este parasita, que julgamos não ter sido ainda descrito, damos o nome de *Haemogregarina moringa* n. sp.

COMENTÁRIOS

A única espécie de hemoparasita de peixe marinho do Brasil até hoje descrita foi, como já assinalamos, uma hemogregarina da tainha, por Carini [2] em 1933. Depois desse trabalho não tivemos conhecimento de outras publicações abordando o assunto. Na Argentina, Bacigalupo e De La Plaza [1], estudaram os tripanossomos dos peixes do mar da Prata.

PESSOA, S.B. & BIASI, P. Sobre uma hemogregarina e um tripanossomo de peixe de mar de São Paulo (Brasil).
Mem. Inst. Butantan, 39: 79-83, 1975.

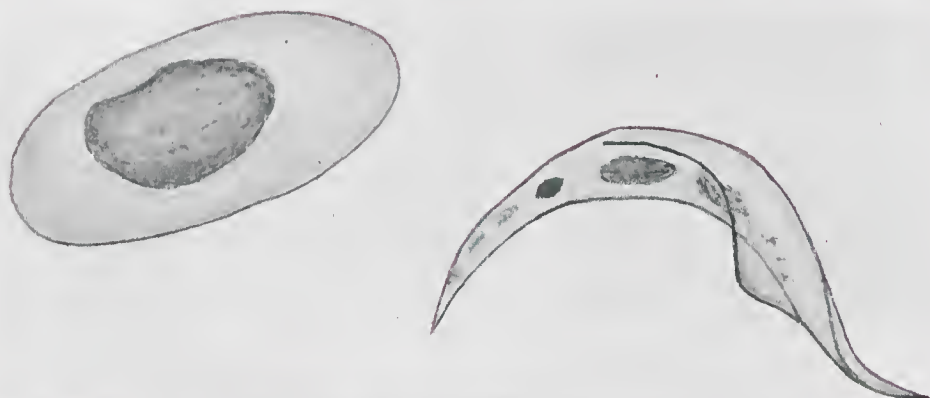
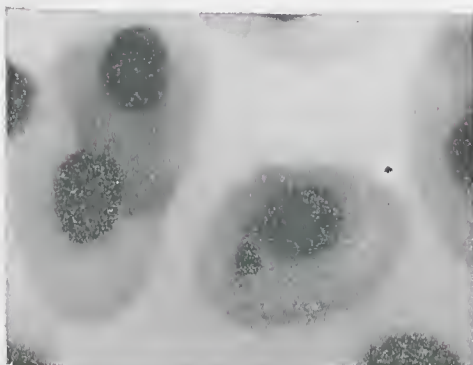
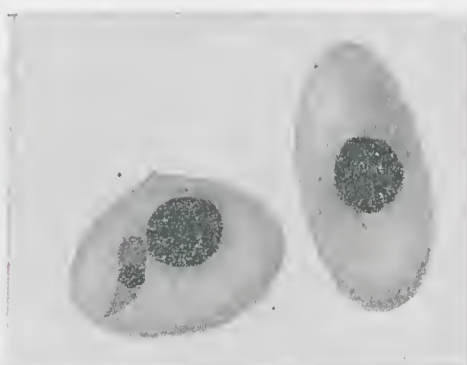
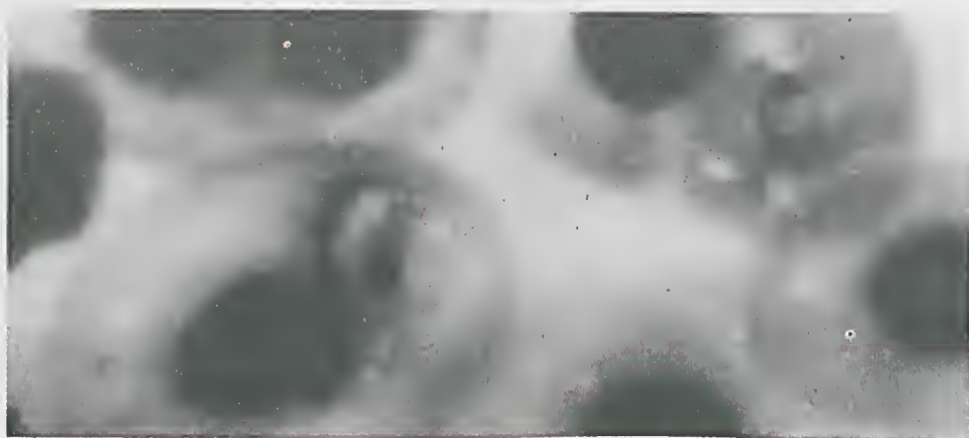
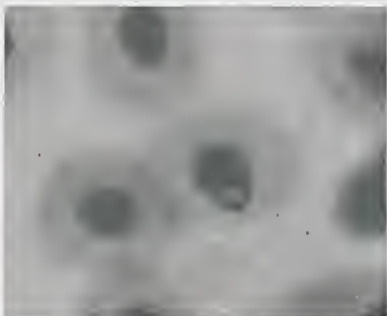
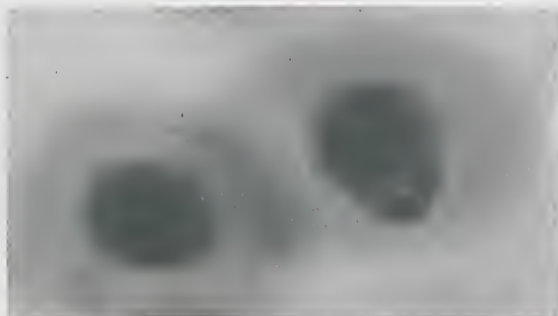



Fig. 1 - Microfotografia de *Trypanosoma radiale* em esfregaço de sangue de michole *(Diplectrum radiale)*. Notar a tênue membrana ondulante e o cinetoplasto no terço posterior do flagelado. (× 2300).

Fig. 2 - Desenho da microfotografia anterior.

Fig. 3 - Microfotografia de *Haemogregarina moringa* em esfregaços de sangue de moréia *(Gymnothorax moringa)*, mostrando o parasita em forma de crescente e próximo ao núcleo da hemácia. (× 1500).

Fig. 4 - Desenho da microfotografia anterior.

5

6

7

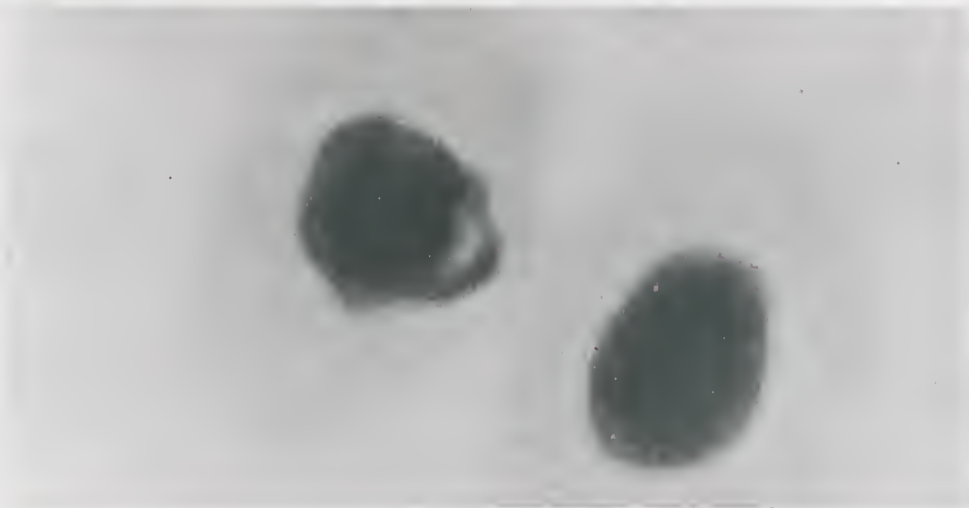



Fig. 5 - Formas de *H. moringa*: prováveis esquizontes jovens (× 3800).

Fig. 6 - Forma semi-lunar do parasita, com as extremidades tocando o núcleo da hemácia. (× 1100).

Fig. 7 - Detalhe da fig. 6. (× 2100).

Fig. 8 - Parasita em outra hemácia, apresentando forma semelhante à da microfotografia anterior. (× 4700).

PESSÔA, S.B. & BIASI, P. Sobre uma hemogregarina e um tripanossomo de peixe de mar de São Paulo (Brasil).
Mem. Inst. Butantan, 39: 79-83, 1975.

Relatou-nos pessoalmente, O. Froés (da Faculdade de Medicina da Universidade do Rio Grande do Sul), ter examinado o sangue de várias espécies de peixes marinhos capturados em águas daquele Estado, com resultados negativos.

Além dos parasitas figurados acima (Figs. 3 e 5) também encontramos na mesma moréia certas formas semi-lunares que por suas extremidades tocam no núcleo da hemácia. Nelas pode-se perceber um núcleo situado no centro de seu corpo (Figs. 6 e 8). Estes organismos assemelham-se a formas descritas por Henry em sangue de peixes europeus [4].

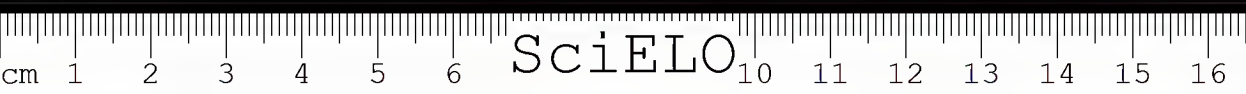
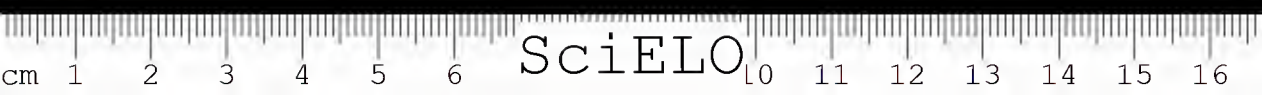
ABSTRACT: In this paper the authors describe *Haemogregarina moringa* n. sp., haemoparasite of the fish "moreia" *(Gymnothorax moringa)* and *Trypanosoma radiale* n. sp., in the blood of the fish "michole" *(Diplectrum radiale)*, collected in São Sebastião, S.P., Brazil.

UNITERMS: Fish. *Haemogregarina. Trypanosoma.* Hemoparasites.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BACIGALUPO, J. & DE LA PLAZA, N. Presencia de tripanosomas en las rayas de Mar del Plata: *Trypanosoma marplatensis* n. sp. *Rev. Soc. arg. Biol., 24:* 269-274, 1948.
2. CARINI, A. Sobre uma hemogregarina de um peixe do mar do Brasil. *Arch. Biol.* (S. Paulo), *172:* 13, 1933.
3. HALSTEAD, B.W. & COURVILLE, D.H. Poisonous and Venomous Marine Animals of the World. Washington, U.S. Government Printing Office, 1967, v. 2, p. 953.
4. WENYON, C.M. *Haematractidium* Henry, 1910. *Protozoology, 2:* 1064-1065, 1929.

Recebido para publicação em 22-V-1975 e aceito em 28-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 85-101, 1975

NOTA SOBRE FORMAS EVOLUTIVAS DE *TRYPANOSOMA* DE SERPENTES EM MEIO DE CULTURA. *

PERSIO DE BIASI, SAMUEL B. PESSÔA, GIUSEPPE PUORTO
e WILSON FERNANDES
Secção de Venenos, Instituto Butantan

RESUMO: Os autores estudaram em meio de cultura de N.N.N., original e modificado com sangue de serpente ao invés de sangue de coelho, formas evolutivas de duas espécies de *Trypanosoma* de serpentes: *T. salamantae* (parasita da *Epicrates cenchria crassus*) e *T. phylodriasi* (parasita da *Philodryas nattereri*). Não encontraram nas formas evolutivas de ambas as espécies de *Trypanosoma* diferenças significativas.

Assinalam que nos organismos destes tripanossomos que se multiplicam por fissão longitudinal a divisão é rápida, enquanto que o processo de individualização é lento naqueles em divisão múltipla ("roseta").

Fizeram experiências de inoculação subcutânea ou por administração "per os", de meios de cultura com *T. salamantae* e *T. phylodriasi* em filhotes de serpentes criadas em laboratório. Resultados positivos foram obtidos com dois filhotes de *Bothrops alternatus* ("urutu") inoculados por via subcutânea com culturas de *T. phylodriasi*. Os demais foram negativos.

Experiências de evolução do *T. salamantae* e do *T. phylodriasi* em mosquitos *Culex fatigans* e *C. dolosus* que picaram as serpentes parasitadas e se engurgitaram de sangue, deram resultados negativos, exceto um exemplar de *C. dolosus* que apresentou formas evolutivas flageladas, mostrando a possibilidade de ser este mosquito vetor potencial.

UNITERMOS: *Trypanosoma*. Hemoparasitas. Serpentes. Cultura de Tripanossomo. Transmissão experimental.

INTRODUÇÃO

Ao contrário do que se verifica com os tripanossomos de anfíbios, aqueles que parasitam as serpentes se constituem num dos grupos menos estudados dentre os tripanossomos encontrados nos vertebrados heterotérmicos.

---

* Trabalho executado com auxílio do Fundo de Pesquisas do Instituto Butantan
Endereço para correspondência: Caixa postal 65 - São Paulo - Brasil

Isto se deve a uma série de razões, dentre as quais podemos destacar: serpentes parasitadas por tripanossomos são pouco frequentes; quando apresentam estes parasitas, são eles encontrados em pequeno número no sangue periférico; quando em cativeiro, mesmo as serpentes não venenosas, sobrevivem menos e são mais difíceis e susceptíveis ao manuseio do que os anfíbios; raramente encontramos em curto espaço de tempo, mais de um exemplar de uma mesma espécie parasitada por tripanossomo.

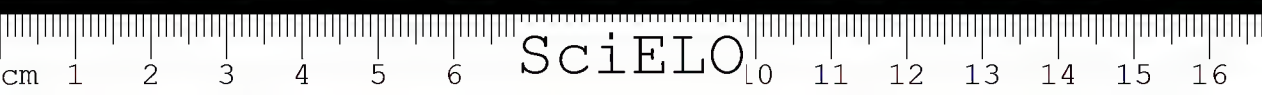
Em relação a este último fato, podemos citar como exemplo o *T. erythrolampri* descrito por Wenyon [18] em 1908, em serpente da América do Sul, o qual, ao que nos consta, nunca mais foi visto por qualquer outro pesquisador. Nós mesmos, nestes últimos oito anos examinamos, provenientes de várias regiões do Brasil, 34 exemplares de *Erythrolamprus aesculapii,* serpente em que foi encontrado o *T. erythrolampri* e não encontramos um único exemplar parasitado por ele. No entretanto, cêrca de 40% destes ofídios eram parasitados por outro hemoparasita (*Hepatozoon*), o que também fôra verificado por Wenyon nestas serpentes. Outro exemplo temos com *T. merremii* e *T. butantanensis* parasitas da *Waglerophis merremii* (=*Xenodon merremii*) descritos por Arantes & Fonseca [1] (1931) que tiveram de examinar, segundo eles, dezenas de exemplares durante alguns anos, para encontrar quatro parasitados por *T. butantanensis* e seis outros por *T. merremii.* De 146 exemplares desta serpente por nós examinados, somente um deles estava parasitado por tripanossomo. Também queremos nos referir ao fato de termos examinado cêrca de 200 serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *C. d. colillineatus* para encontrarmos quase seguidamente 4 exemplares parasitados pelo *Trypanosoma cascavelli* Pessôa & Biasi [16], 1972. Posteriormente examinamos o sangue de cêrca de 100 outras serpentes da mesma espécie, sem termos encontrado uma única cobra parasitada.

Algumas serpentes apesar de ocuparem "habitat" semelhante apresentam diferenças acentuadas na frequência desses hemoparasitas: a *Rachidelus brazili* ("falsa-muçurana") serpente de hábito aquático, pouco frequente, apresenta alta taxa de parasitismo por tripanossomo, pois em 21 cobras examinadas, encontramos seis — 30% — que mostravam tripanossomo. As "boipevas" (*Waglerophis merremii*) que possuem hábito aquático semelhante à espécie anterior ou então são de lugares úmidos, apresentam como vimos, baixa percentagem de infecção para estes parasitas.

Como se sabe, a transmissão dos tripanossomos nos casos de serpentes de hábito aquático se faz por meio de sanguessugas. Segundo Brumpt [7] (1914), o *T. brazili* parasita da *Helicops modesta* é transmitido por sanguessugas (*Placobdella brasiliensis* e *P. catenigera*). Em relação às serpentes terrestres e arborícolas, provavelmente ocorra por meio de insetos hematófagos. É difícil de se cogitar sobre qual destes vetores é o mais eficiente no mecanismo de transmissão dos tripanossomos.

Laveran & Mesnil [12] (1904) citam, mas sem comprovação positiva, a possível transmissão de tripanossomos nos répteis através dos carrapatos.

Há outros pontos que nos parecem obscuros: em certas épocas do ano desaparece praticamente a infecção das serpentes por tripanossomo, mas perma-

necem aquelas determinadas por *Hepatozoon*; em exemplares de algumas espécies de serpentes conseguimos encontrar parasitismo só por tripanossomo; exemplares de outras espécies (p.ex. *Micrurus*) aparentemente não apresentam hemoparasitas. Isto nos leva a recomendar maiores estudos experimentais sobre a transmissão destes hemoparasitas, afim de conseguirmos melhor compreensão da sua fenomenologia.

De uma maneira geral, as espécies de *Trypanosoma* das serpentes foram descritas baseadas na morfologia das formas encontradas nos hospedeiros vertebrados, sendo em geral pouco conhecida a morfologia de suas formas evolutivas, as quais, em outros répteis (na maioria lagartos) foram observadas e descritas nos vetores invertebrados que são em geral insetos (mosquitos e flebótomos) ou sanguessugas (hirudíneos).

Em nossas serpentes, Arantes & Fonseca [1] assinalaram formas evolutivas do *T. butantanense* no sangue periférico da *Ophis merremii* (=*Waglerophis merremii*) e também em meio de N.N.N; Pessôa e Fleury [17] (1969) observaram na *Haementeria lutzi* (sanguessuga) formas evolutivas do *T. hogei* parasita da *Rachidelus brazili;* do *T. cascavelli*, apesar das experiências com mosquitos do gênero *Culex* (*C. fatigans* e *C. dolosus*), "barbeiros" (*Triatoma infestans*) e sanguessuga (*Haementeria gracilis*), só foram observados tripanossomos aglutinados e parcialmente lisados nas sanguessugas (Pessôa & Biasi [16]).

MATERIAL E MÉTODOS

Trabalhamos com as serpentes n.^{os} NS — 787 (*Epicrates cenchria crassus*), popularmente conhecida por "salamanta", chegada ao Instituto Butantan no dia 09/05/74 e NS — 800 (*Philodryas nattereri*) recebida no dia 20/05/74, ambas de procedência desconhecida e respectivamente parasitadas pelo *Trypanosoma salamantae* Pessôa & Fleury [17], 1969 e *T. phylodriasi* Pessôa [15], 1928.

O sangue destas serpentes foi colhido por punção direta no coração do animal, com seringa e agulha estéreis, ou asséticamente com pipeta Pasteur através de corte na extremidade da cauda da serpente.

O sangue colhido foi semeado em tubos de ensaio com meio de N.N.N., mantidos a 26°C.

Utilizamos este meio de cultura, deixando de experimentar outros, pelo fato de ser o meio que mais facilmente obtivemos através da colaboração da Seção Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, uma vez que, nossas experiências são desenvolvidas na Secção de Venenos do Instituto Butantan, especializada na colheita de venenos de serpentes peçonhentas.

Os esfregaços, tanto da cultura como de sangue, foram fixados pelo metanol e corados pelo Giemsa ou pelo May Grünwald-Giemsa.

Em geral, os organismos corados pelo May Grünwald-Giemsa mostraram melhor as suas estruturas do que quando corados só pelo Giemsa. Os núcleos dos parasitas mostram-se avermelhados, citoplasma com granulações e vacúolos bem evidentes.

BIASI, P.; PESSÔA, S.B.; PUORTO, G. & FERNANDES, W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpentes em meio de cultura. *Mem. Inst. Butantan*, *39*: 85-101, 1975.

As duas espécies de *Trypanosoma* com que trabalhamos foram suficientemente descritas em seus trabalhos originais de modo que achamos desnecessária a redescrição (Figs. 1 e 21).

Além de algumas microfotografias, também fizemos em maior número desenhos dos parasitas, por se tratar de organismos cuja estrutura é complexa e pode ser melhor representada por desenhos.

Nas experiências de transmissão em filhotes de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* criados em laboratório, procedemos à inoculação sub-cutânea ou administramos "per os", culturas em N.N.N., positivas para *T. salamantae* e *T. phylodriasi* e triturados de mosquitos *Culex dolosus* e *C. fatigans* engurgitados com sangue parasitado das serpentes *E. c. crassus* e *P. nattereri*.

Os mosquitos foram criados na Seção de Arboviroses do Instituto Adolfo Lutz e mantidos em gaiolas apropriadas, contendo 50 a 60 mosquitos cada uma. As experiências foram feitas conforme técnicas descritas anteriormente (Biasi e cols [4]).

RESULTADOS

Na maioria das vezes, 48 horas após havermos semeado sangue de *E. c. crassus* ou de *P. nattereri* positivo, respectivamente, para *T. salamantae* e *T. phylodriasi*, em tubos de ensaio com meio de cultura de N.N.N., já eram observadas formas evolutivas daqueles tripanossomos. O período de permanência dos organismos vivos nas culturas não é em geral muito longo, pois, rapidamente elas se apresentam contaminadas, levando-nos a crer que o sangue das serpentes apresenta contaminação natural. Todavia uma das culturas de *T. phylodriasi* manteve-se estéril por mais de 45 dias.

O meio de N.N.N., que modificamos substituindo o sangue de coelho pelo sangue de serpente não se mostrou mais favorável do que o meio original. Realmente encontramos, em tais condições, poucas formas evolutivas de tripanossomo, mesmo quando a cultura era examinada 4 a 5 dias após a semeadura.

Em todas as culturas pudemos identificar formas que classificamos como amastigota, promastigota e epimastigota, ao lado de outras que se mostravam ou não em divisão e que dificilmente pudemos relacioná-las com uma das clássicas formas evolutivas dos flagelados. Não conseguimos identificar formas típicas de tripomastigota, mas acreditamos estarem elas presentes nas culturas visto termos conseguido infectar cobrinhas negativas para estes protozoários. Admite-se serem as formas tripomastigota as únicas infectantes.

a) Formas evolutivas do *Trypanosoma salamantae*:

Nota-se uma grande variação no tamanho de uma mesma forma evolutiva destes flagelados. Encontram-se alguns organismos de dimensões relativamente pequenas e outros maiores como amastigota com cêrca de 7 a 18 microns (Figs. 2 a 6), promastigota com 14 a 36 microns (Figs. 7 a 9) e epimastigota com 18 a 27 microns (Figs. 10 a 14).

BIASI, P.; PESSÔA, S.B.; PUORTO, G. & FERNANDES, W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpentes em meio de cultura.
Mem. Inst. Butantan, 39: 85-101, 1975.

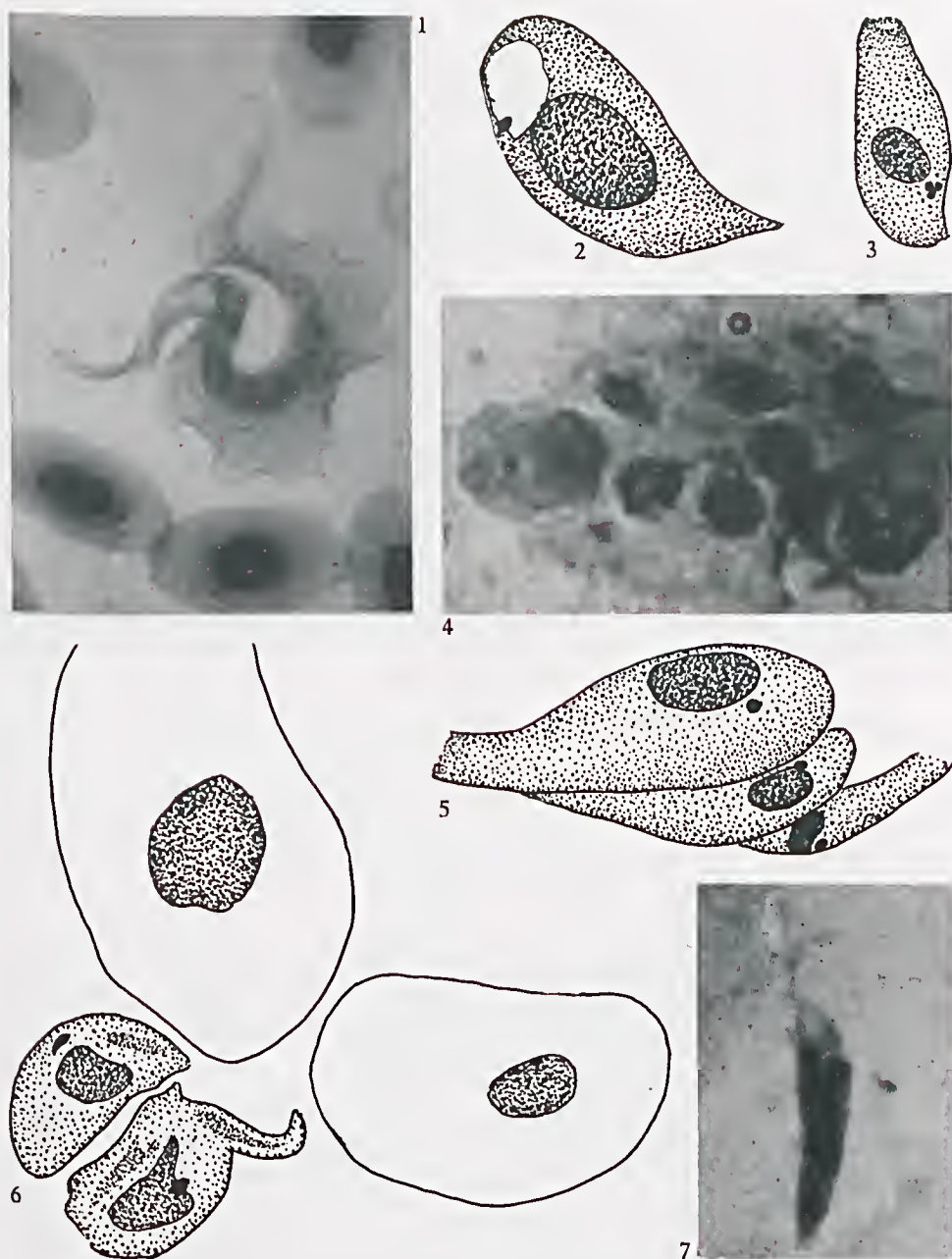



Fig. 1 - *Trypanosoma salamantae*. Esfregaço de sangue da serpente *Epicrates cenchria crassus* (× 1800).

Figs. 2 a 7 - Formas evolutivas de *T. salamantae* em meio NNN*: 2 - Forma amastigota: notar o reservatório no cinetoplasto. 3 - Forma amastigota: notar o cinetoplasto dividido em 3 partes. 4 - Agrupamento (roseta) com 8 organismos (× 2600). 5 - Agrupamento de forma multiplicativa, com 3 organismos. 6 - Dois organismos amastigota. 7 - Forma promastigota (× 2300).

* O tamanho dos organismos desenhados acha-se referido no texto.

Nas culturas desta espécie de *Trypanosoma* há predominantemente organismos isolados, sendo poucos os casos em que são eles encontrados agrupados ("rosetas"). Neste caso, é pequeno o n.º de indivíduos associados não ultrapassando em geral 6 a 8 (Figs. 4 e 5).

Amastigota: tem o citoplasma granuloso (Figs. 2, 3 e 5), o cinetoplasto algumas vezes circundado por uma área hialina — reservatório — (Fig. 2); nas formas em multiplicação verifica-se primeiramente uma divisão do cinetoplasto (Fig. 3), podendo-se encontrar duas ou mais destas organelas num mesmo indivíduo.

Promastigota: o núcleo nestes organismos, se localiza em geral, no terço anterior do corpo (Figs. 7 e 8); citoplasma também granuloso e,em alguns casos, o reservatório é visível (Fig. 8); flagelo de comprimento variável alcançando até 20 microns.

Um destes organismos em divisão, apresenta dois flagelos com respectivos cinetoplastos individualizados; o citoplasma, em começo de fissão longitudinal mostra cinco massas cromáticas que nos levam a pensar tratar-se de um organismo em divisão mútlipla (Fig. 9).

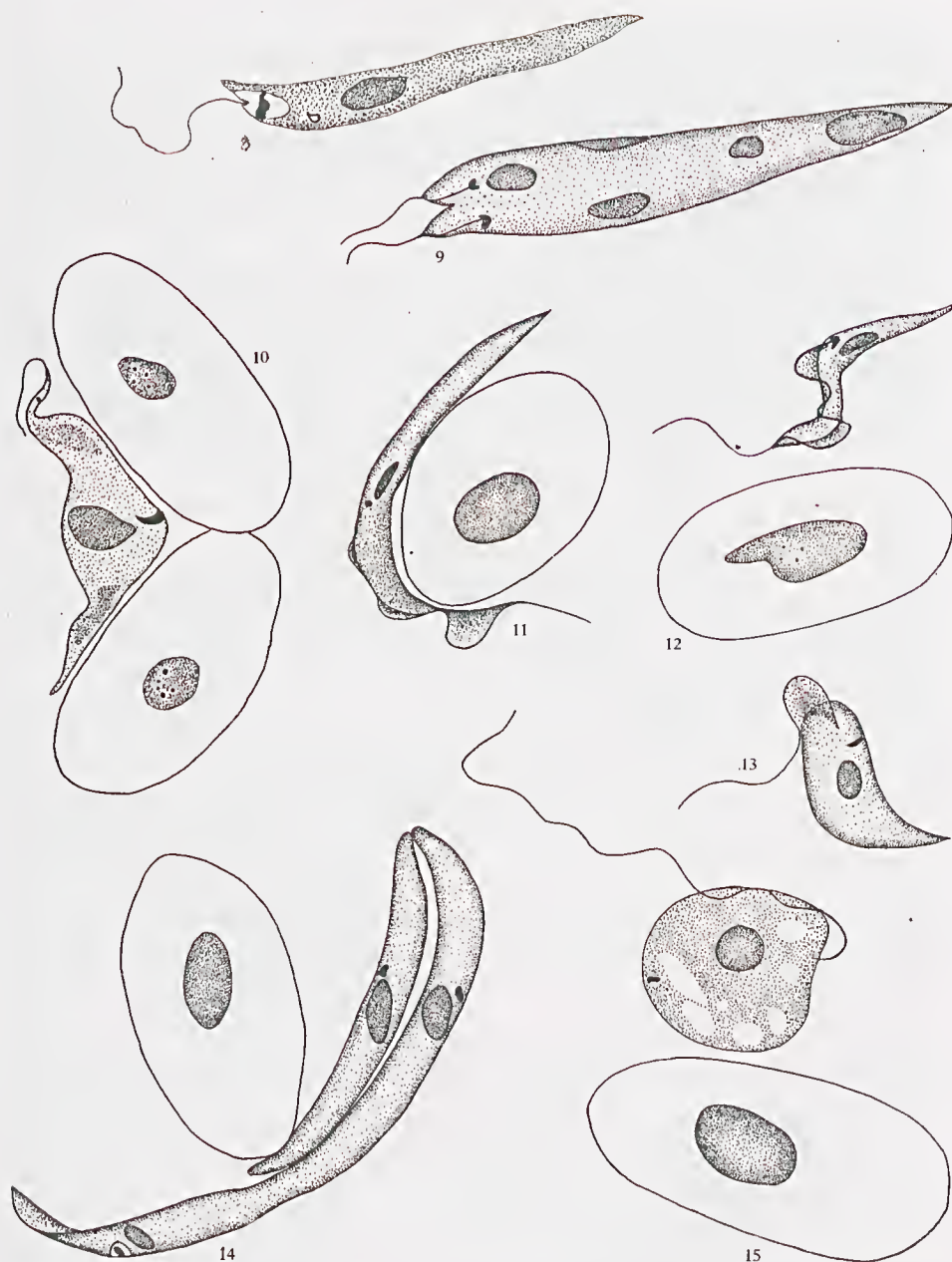
Epimastigota: organismos de tamanho variável, com inúmeros deles apresentando uma membrana ondulante bem visível (Figs. 11 a 13), enquanto outros não tem membrana evidente (Figs. 10 e 14).

Algumas formas evolutivas peculiares foram notadas e dentre elas destacamos:

a) dois organismos paralelos, um deles já individualizado enquanto que o outro, com aproximadamente o dôbro do comprimento, apresenta um núcleo e um cinetoplasto em cada extremidade, deixando entrever que está concluindo a sua divisão por fissão longitudinal (Fig. 14);

b) organismo em forma esférica ("esferimastigota ou pirimastigota"), com flagelo e cinetoplasto em polos opostos (Fig. 15). Parece-nos que quando estes organismos adquirem esta forma, tendem a evoluir para uma fase multiplicativa, aumentando o volume de seu citoplasma e adquirindo, em seguida, um aspecto amebóide, às vezes desprovido de flagelo.

c) o parasita apresenta a massa citoplasmática em princípios de fissão longitudinal, podendo-se notar já formados dois núcleos e dois cinetoplastos, bem como as respectivas membranas ondulantes (Figs. 16 e 17).

d) organismo com larga área citoplasmática granulosa e grande vacúolo central junto ao qual há dois núcleos e logo atrás deles um cinetoplasto com pequeno flagelo. A área citoplasmática forma estreito prolongamento em S, cuja extremidade posterior bifurca-se num ramo curto e outro longo. Ao lado do ramo menor vê-se um cinetoplasto que se encontra fora do citoplasma (Dutton e cols. [10] em 1907, observaram que o flagelo pode ser desprendido e abandonado juntamente com o cinetoplasto). O ramo maior curva-se em 180º retornando sobre a área citoplasmática inicial onde forma uma nova membrana ondulante (Fig. 18).

Figs. 8 a 15 - Formas evolutivas de *T. salamantae* em meio NNN*: 8 - Forma promastigota com reservatório e cinetoplasto. 9 - Forma promastigota em fissão longitudinal. Notar cinetoplasto e flagelo divididos; presença de 5 massas cromáticas. 10 - Forma epimastigota sem membrana ondulante aparente. 11, 12 e 13 - Formas epimastigota com membrana ondulante aparente. 14 - Forma epimastigota em divisão, notando-se um organismo isolado e outro em fase final de divisão. 15 - Forma "esferimastigota" ou "pirimastigota", notando-se flagelo e cinetoplasto em polos opostos.

* O tamanho dos organismos desenhados acha-se referido no texto.

b) Formas evolutivas do *Trypanosoma phylodriasi*:

Em meios de cultura de N.N.N., semeado com sangue da *P. nattereri* infectada com o *T. phylodriasi* desenvolveram-se como nas culturas da espécie anterior, indivíduos amastigota, promastigota e epimastigota, com tamanhos variáveis dentro de uma mesma forma evolutiva e aproximadamente iguais aos do *T. salamantae*. São encontrados frequentes agrupamentos ("rosetas") de organismos em multiplicação, podendo-se contar neles até 27 organismos ou mais (Figs. 19, 20, 22 e 23).

As formas evolutivas do *T. phylodriasi* (amastigota, promastigota e epimastigota), são muito semelhantes àquelas do *T. salamantae* (Figs. 19, 20 e 22 a 26); alguns organismos resultantes da multiplicação, que podemos considerar como formas promastigota, porém sem flagelo aparente, apresentam numa das extremidades uma área de citoplasma hialino, não chegando a se constituir ainda numa verdadeira membrana ondulante. Esta área cora-se ligeiramente em róseo pelo May Grünwald-Giemsa, (Figs. 19 e 20).

Nas culturas do *T. phylodriasi* em N.N.N., pudemos observar algumas formas peculiares que se tratam em geral de organismos em fase de multiplicação: a) indivíduo longo de extremidades alongadas e finas, com flagelo, portando 2 núcleos e 2 cinctoplastos (Fig. 27); b) forma aparentemente epimastigota, mas sem flagelo, só com membrana ondulante, com 3 núcleos (Fig. 28); c) organismo em fissão longitudinal, apresentando um só núcleo, porém o cinetoplasto dividido em 2 granulos (Fig. 29); d) forma evolutiva com 2 núcleos próximos, 2 cinetoplastos separados, partindo de cada um deles um flagelo, que ao sairem do corpo celular unem-se formando um flagelo único (Fig. 30); e) organismo com 2 núcleos bem evidentes, cinetoplasto bipartido, porém ainda próximos e na extremidade do flagelo aparece uma pequena área de expansão citoplasmática (Fig. 31); f) forma epimastigota em término de fissão longitudinal, ligados sómente por pequena ponte citoplasmática (Fig. 32); g) forma evolutiva com 2 grandes vacúolos na massa citoplasmática (Fig. 33); h) organismo estreito alongado com grande dilatação vacuolar em uma de suas extremidades (Fig. 34).

EXPERIÊNCIAS COM MOSQUITOS E INOCULAÇÕES EM SERPENTES

Ambas as serpentes, *E. c. crassus* ("salamanta"), NS — 787, e *P. nattereri*, NS — 800, foram colocadas em gaiolas com mosquitos *Culex fatigans* e *C. dolosus* para serem sugadas. Foram feitas três tentativas em datas diferentes e 24, 48 e 72 horas após os mosquitos terem se engurgitado com sangue das serpentes foram alguns deles dissecados. Em lâminas confeccionadas com um dos mosquitos da primeira experiência, após coloração com Giemsa foram identificadas duas formas que acreditamos serem formas evolutivas do *T. phylodriasi* (Figs. 35 e 36). Na terceira experiência que fizemos, quando colocamos a *E. c. crassus* ("salamanta") para os mosquitos *C. dolosus* sugarem, 24 horas após a sucção um dos mosquitos dissecados apresentava formas evolutivas flageladas, em movimentação, que infelizmente não se coraram satisfatoriamente pelo Giemsa, não permitindo microfotografias.

BIASI, P.; PESSÔA, S.B.; PUORTO, G. & FERNANDES, W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpentes em meio de cultura.
Mem. Inst. Butantan, 39: 85-101, 1975.

Figs. 16 a 18 - Formas evolutivas de *T. salamantae* em meio NNN*: 16 e 17 - Organismo em divisão, notando-se dois flagelos, dois cinetoplastos e dois núcleos. Início de fissão longitudinal do citoplasma (Fig. 17 - × 2.000). 18 - Organismo em multiplicação, apresentando duas massas cromáticas, grande vacúolo, cinetoplasto com pequeno flagelo, prolongamento citoplasmático bipartido, com um cinetoplasto; outro cinetoplasto fora do citoplasma, no ramo menor da bifurcação. 19 e 20 - *Trypanosoma phylodriasi:* agrupamento (roseta) de formas promastigota.*

* O tamanho dos organismos desenhados acha-se referido no texto.

BIASI, P.; PESSOA, S.B.; PUORTO, G. & FERNANDES, W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpentes em meio de cultura.
Mem. Inst. Butantan, 39: 85-101, 1975.

Culturas em meio de N.N.N., do *T. salamantae* e *T. phylodriasi*, bem como triturado de mosquitos *C. fatigans* e *C. dolosus* engurgitados com sangue da "salamanta" — *E. c. crassus* — e da *P. nattereri* foram inoculados ou administramos "per os" nos seguintes filhotes de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* nascidos e mantidos no laboratório em caixas a prova de prováveis vetores: 4 filhotes de *C. durissus terrificus* ("cascavel"), 1 de *B. neuwiedi* ("jararaca-pintada"), 1 de *B. jararacussu* ("jararacussu") e 4 de *B. alternatus* ("urutu").

Obtivemos resultados positivos para 2 filhotes de *B. alternatus* ("urutu"), que 5 dias após a inoculação da cultura de N.N.N., semeada com *T. phylodriasi*, apresentaram formas sanguíneas deste tripanossomo (Figs. 37 e 38).

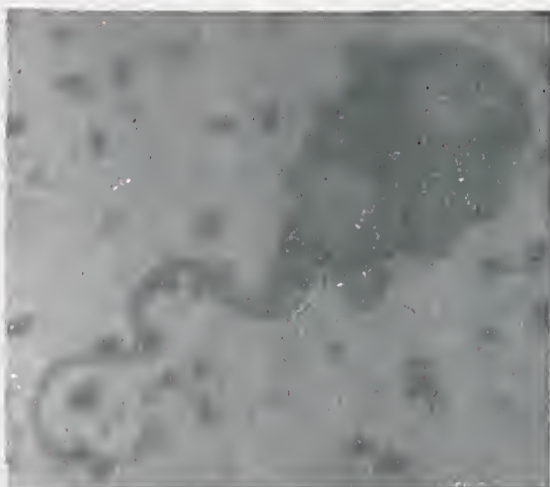
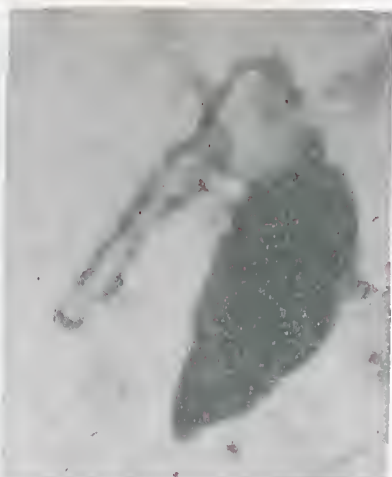
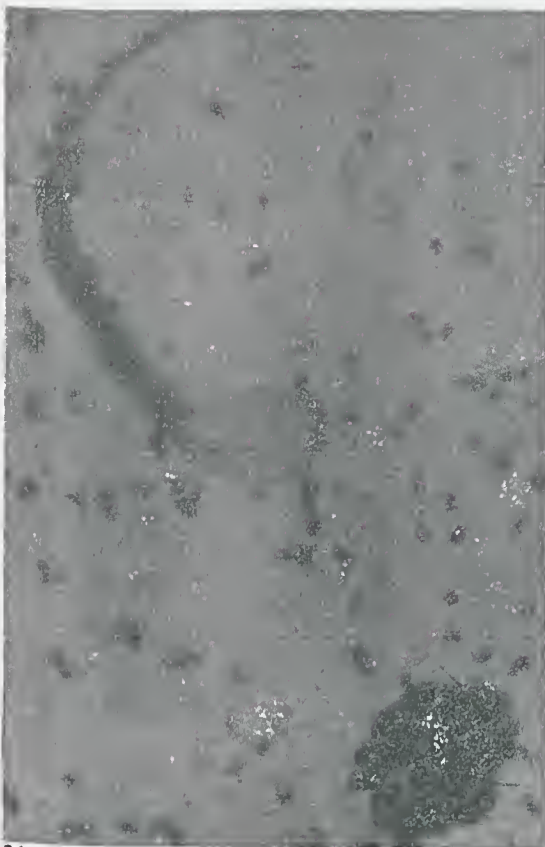
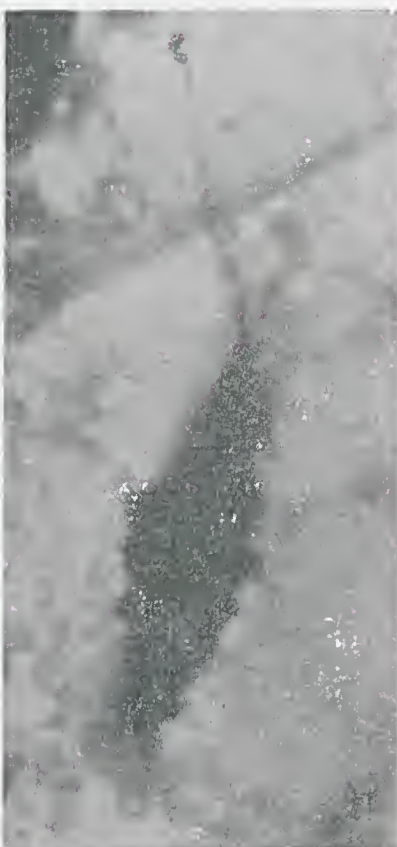
COMENTÁRIOS E CONCLUSÕES

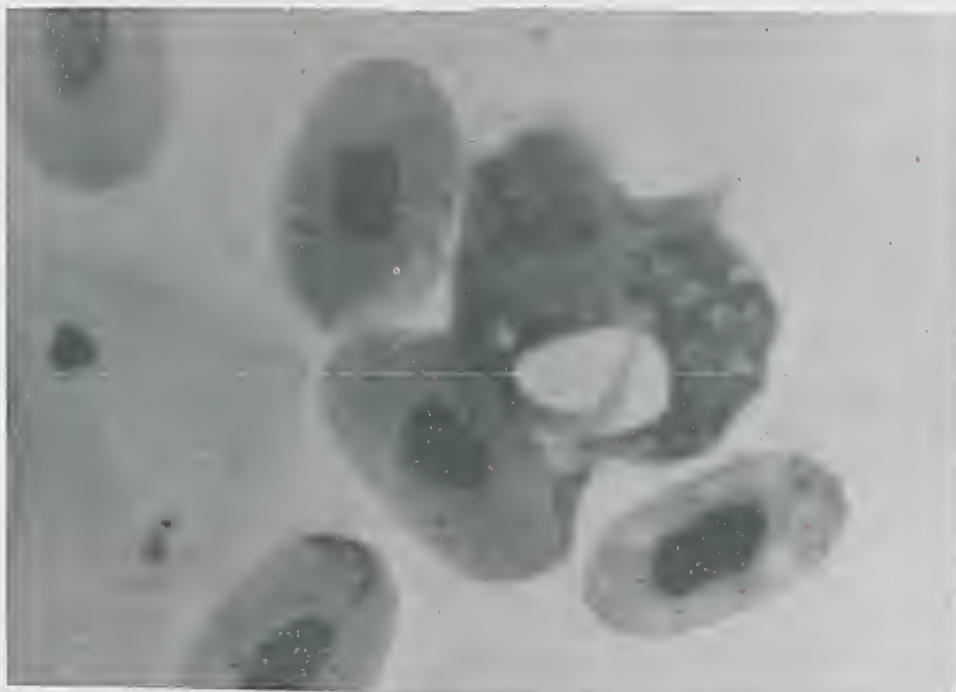
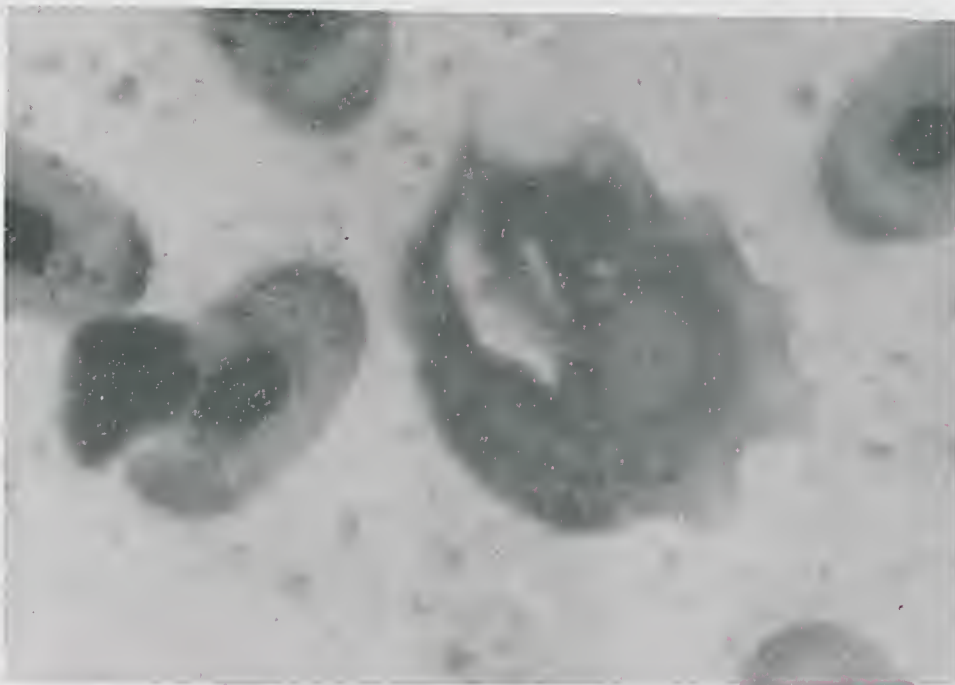
As espécies de *Trypanosoma* que parasitam os répteis e outros animais de sangue frio, tem sido identificadas principalmente com base no seu hospedeiro vertebrado. Os caractéres morfológicos destes flagelados (comprimento do corpo e flagelo, posição relativa do núcleo e cinetoplasto, aspecto da membrana ondulante, etc.) nem sempre tem se revelado suficientes para a diferenciação específica.

Através do reconhecimento dos vetores e das formas evolutivas dos tripanossomos, quer nos hospedeiros intermediários, quer nos meios de cultura, os autores tem procurado encontrar caractéres diferenciais que permitam melhor identificação específica dos tripanossomos de répteis ou de outros animais heterotérmicos.

Entre os mais antigos estudos das formas evolutivas de tripanossomos dos vertebrados de sangue frio, temos o de Bouet [5] que observou estes flagelados do sangue de rã em meio de cultura; o de Brumpt [6] que as descreveu em sanguessugas que sugaram lagartixas positivas para tripanossomos e o de Dutton e cols. [10] que as observaram em preparações a fresco, do sangue de diversos vertebrados com tripanossomo.

Mais recentemente, nos animais heterotérmicos citamos, para os anfíbios: Lehmann [13] que em sanguessuga do gênero *Erpobdella* verificou formas evolutivas do *T. ambystome* parasita do *Taricha granulosa* ("salamandra"); Bailey [3] que estudou formas do tripanossomo de rã em *Aedes aegypti*, admitindo ser este inseto provável vetor; Pereira e cols. [14] que, estudaram em meio de cultura formas evolutivas do *T. rotatorium*, parasita de rãs, assinalando como vetor o *Culex territans*. Dos tripanossomos de répteis alguns autores estudaram formas evolutivas nos hospedeiros intermediários, citando-se para os Sauria, Fromentin [11] que em meio de cultura observa o *T. therezieni*, parasita do camaleão, *Chamaeleo brevicornis;* Ayala e cols. [2] que identificaram o flebotomíneo *Lutzomya vexatrix occidentalis* como provável vetor do *T. thecadactyli* parasita do geconídeo *Thecadactylus rapicaudus*; e para as serpentes, Pessôa e Fleury [17] que assinalaram a sanguessuga *Haementeria lutzi* como hospedeiro intermediário do *T. hogei*, parasita da *Rachidelus brazili* ("falsa-muçurana"). Ainda fazemos menção do trabalho de Arantes & Fonseca [1] que em meio de cultura e por inoculação direta em serpentes, observaram formas evolutivas do *T. butantanense* parasita da *Waglerophis merremii* (=Xenodon merremii).

BIASI, P.; PESSOA, S.B.; PUORTO, G. & FERNANDES, W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpentes em meio de cultura.
Mem. Inst. Butantan, 39: 85-101, 1975.

Figs. 33 e 34 - *Trypanosoma phylodriasi*: formas evolutivas em meio NNN. 33 - Forma evolutiva aparentemente "piriforme", portando dois grandes vacúolos no citoplasma. (× 1500). 34 - Forma evolutiva com grande vacúolo em uma das extremidades. (× 1800).

Figs. 35 e 36 - *Trypanosoma phylodriasi*: prováveis formas evolutivas em *Culex fatigans* (× 1400).

37

38

Figs. 37 e 38 - Formas sangüíneas de *Trypanosoma phylodriasi* em sangue de filhotes de *Bothrops alternatus* inoculados com cultura de triponossomo em NNN. (× 2600).

BIASI, P.; PESSÔA, S.B.; PUORTO, G. & FERNANDES, W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpentes em meio de cultura.
Mem. Inst. Butantan, 39: 85-101, 1975.

No presente trabalho estudamos formas evolutivas de duas espécies de *Trypanosoma*, uma parasita da "salamanta" — *Epicrates cenchria crassus* — o *T. salamantae* e outra parasita da *Philodryas nattereri*, o *T. phylodryasi*, em meio de cultura de N.N.N., tanto no meio original como em meio modificado pela substituição do sangue de coelho por sangue de serpente. O meio de N.N.N., original, mostrou-se melhor que o modificado com sangue de serpente, apresentando mais rapidamente o aparecimento das formas evolutivas das espécies de *Trypanosoma* semeados.

O *T. phylodriasi* mostrou melhor desenvolvimento do que o *T. salamantae* em meio de N.N.N., originando culturas com maior número de organismos.

As formas evolutivas das duas espécies de *Trypanosoma* estudadas apresentaram ligeiras diferenças que não podemos considerar significativas para a diferenciação específica. Podemos citar que em meio de cultura de N.N.N., grupos multiplicativos ("rosetas") do *T. phylodriasi* mostram até cêrca de 27 organismos ou mais por agrupamento ("roseta"), enquanto que em *T. salamantae* esse número é bem menor (6 a 8); organismos promastigota de *T. phylodriasi* são mais alongados e com área citoplasmática anterior ampla e hialina, melhor evidenciada pela coloração de May Grünwald-Giemsa.

Ao microscópio, em preparações a fresco de culturas em N.N.N., acompanhamos a velocidade de multiplicação de formas evolutivas do *T. salamantae*. Os organismos de um agrupamento ("roseta") observados por mais de uma hora não se individualizaram, enquanto que, em poucos instantes ocorreu em um outro organismo a divisão por fissão longitudinal com a separação de 2 indivíduos.

Alguns invertebrados (insetos e sanguessugas) são vetores potenciais ou transmissores dos tripanossomos de animais de sangue frio, sendo este ainda um campo pouco conhecido da biologia destes flagelados. Em nossas experiências, na tentativa de verificar prováveis vetores do *T. phylodriasi* e *T. salamantae*, utilizamos os mosquitos *Culex dolosus* e *Culex fatigans*. Um dos mosquitos *Culex dolosus* que havia engurgitado sangue da "salamanta" — *E. c. crassus* —, quando dissecado apresentou formas evolutivas flageladas, demonstrando que este mosquito é um transmissor potencial do *T. salamantae*.

Agradecimentos: Agradecemos ao chefe da Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz, Dr. Julio Jacques Parigot de Souza a valiosa cooperação em nossos trabalhos, bem como ao técnico do Instituto Butantan, Sr. Joaquim Cavalheiro. Ainda estendemos os agradecimentos à Dna. Delminda Vargas Travassos pela confecção dos desenhos, ao Dr. Oscar de Souza Lopes, chefe da Seção de Arboviroses do Instituto Adolfo Lutz por nos ter fornecido os mosquitos.

ABSTRACT: In N.N.N. medium, original and modified with snake blood instead of rabbit blood, the authors studied evolutive forms of 2 species of snake *Trypanosoma*: *T. salamantae* (parasite of *Epicrates cenchria crassus*) and *T. phylodriasi* (para-

site of *Philodryas nattereri*). No significant differences were found in the evolutive forms of both species of *Trypanosoma*.

The authors point out that the individualization process is rapid in the organisms multiplying by longitudinal fission, and slow in those of multiple division ("rosette").

Subcutaneous inoculation or application "per os" of culture media with *T. salamantae* and *T. phylodriasi* in laboratory-bred juvenile snakes were carried out. Positive results were obtained in two young *Bothrops alternatus* ("urutu") subcutaneously inoculated with cultures of *T. phylodriasi*. All the other experiments were negative.

Experiments to show the evolution of *T. salamantae* and *T. phylodriasi* in mosquitoes *Culex fatigans* and *C. dolosus* that had sucked blood from parasitized snakes gave negative results, except for one specimen of *C. dolosus* that presented flagellated evolutive forms, wich suggests that mosquitoes are potential vectors.

UNITERMS: *Trypanosoma*. Hemoparasites. Serpentes. *Trypanosoma* culture. Experimental transmission.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARANTES, J.B. & FONSECA, F. Pesquisas sobre Trypanosomas. I. *Trypanosoma butantanense*, sp.n. parasita da serpente *Ophis merremii* Wagler, 1824. *Mem. Inst. Butantan, 6:* 215-222, 1931.

2. AYALA, S.C. & McKAY, J.G. *Trypanosoma gerrhonoti* n.sp. and Extrinsic Development of Lizard Trypanosomes in California Sandflies. *J. Protozool., 18:* 430-433, 1971.

3. BAILEY, J. K. *Aedes aegypti* as a possible new invertebrate host for frog trypanosomes. *Exp. Parasit., 12:* 155-163, 1962.

4. BIASI, P. de; PESSÔA, S.B. & VIEIRA, F.C.G. Nota sobre longa latência de infecção por *Hemogregarina* em uma serpente peçonhenta: *Bothrops moojeni* Hoge, 1965. *Atas Soc. Biol. R. Janeiro, 15*(2): 71-72, 1972.

5. BOUET, G. Culture du Trypanosoma de la grenouille *(Trypanosoma rotatorium). Ann. Inst. Pasteur, 20*(1): 564, 1906.

6. BRUMPT, E. Expériences relatives au mode de transmission des trypanosomes et des trypanoplasmes par les hirudinées. *C. R. Soc. Biol., 61:* 77, 1906.

7. BRUMPT, E. Le xenodiagnostic. Application au diagnostic de quelques infections parasitaires et en particulier à la trypanosome de Chagas. *Bull. Soc. Path. Exot., 7:* 706, 1914.

8. CHRISTENSEN, H. A. & TELFORD JR., S. R. *Trypanosoma thecadactyli* sp.n. from Forest Geckoes in Panama, and its Development in the Sandfly *Lutzomyia trinidadensis* (Newstead) (Diptera, Psychodidae). *J. Protozool., 19:* 403-406, 1972.

9. DESSER, S. S.; McIVER, S. B. & RYCKMAN, A. *Culex territans* as a potential vector of *Trypanosoma rotatorium*. I. Development of the flagellate in the mosquito. *J. Parasit., 54:* 353-358, 1973.

10. DUTTON, J.E.; TODD, J.L. & TOBEY, E.N. Concerning certain parasitic Protozoa observed in Africa. Part. II. *Ann. trop. Med. Parasit., 1:* 287-372, 1907.

BIASI, P. De; PESSÔA, S.B.; PUORTO, G. & FERNANDES, W. Nota sobre formas evolutivas de *Trypanosoma* de serpentes em meio de cultura.
Mem. Inst. Butantan, 39: 85-101, 1975.

11. FROMENTIN, H. Mise en culture de *Trypanosoma therezieni* Brygoo, 1963. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar, 36:* 51-62, 1967.

12. LAVERAN, A. & MESNIL, F. Trypanosomes et Trypanosomiases. Paris, Masson, 1904, p. 1-407.

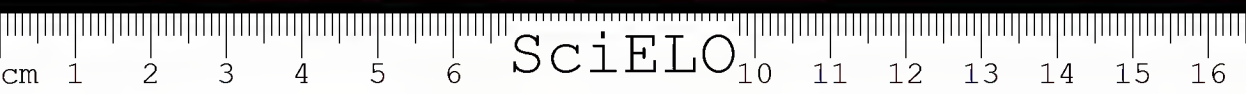
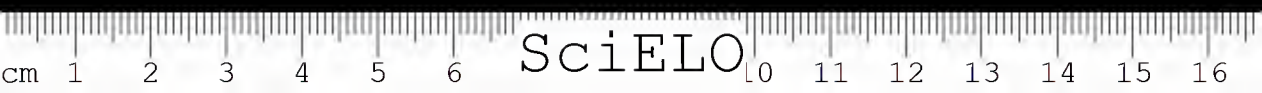
13. LEHMANN, D.L. Notes on the biology of *Trypanosoma ambystomae* Lehmann, 1954. II. The Life cycle in the invertebrate Host. *J. Protozool., 5:* 96-98, 1958.

14. PEREIRA, N.M.; COSTA, S.C.G.; COLOMBO, T. & TRAVASSOS, J.M.C. Formas de cultura de *Trypanosoma rotatorium* Mayer, 1843 - Isolado da rã *Leptodactylus ocellatus*, do Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 71:* 357-367, 1973.

15. PESSÔA, S.B. Contribuição ao estudo dos Hemoparasitas dos Ophideos. I. Nota: Nova espécie de *Trypanosoma* parasita do *Philodryas nattereri*. *Rev. biol. hyg. S. Paulo*, 1(3): 51-62, 1928.

16. PESSÔA, S.B. & BIASI, P. de *Trypanosoma cascavelli* sp.n. parasita da cascavel: *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti). *Atas Soc. Biol. R. Janeiro, 15*(2): 67-70, 1972.

17. PESSÔA, S.B. & FLEURY, G.C. Duas novas espécies de Tripanosomas parasitas de serpentes do Brasil. *Rev. brasil. Biol.*, 29(1): 81-86, 1969.

18. WENYON, C.M. A trypanosome and haemogregarine of a tropical American snake. *Parasitology, 1:* 315, 1908.

Recebido para publicação em 22-V-1975 e aceito em 24-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 103-121, 1975

KALICEPHALUS SUBULATUS MOLIN, 1861 (*NEMATODA, DIAPHANOCEPHALIDAE*). CONFIRMAÇÃO DESTA ESPÉCIE; INFORMAÇÕES SOBRE SUA DISPERSÃO GEOGRÁFICA E ENUMERAÇÃO DE SERPENTES PARASITADAS. *

MARIA DA PENHA MAIA FERNANDES e PAULO DE TOLEDO ARTIGAS
Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, U.S.P.

RESUMO: É confirmada neste trabalho a espécie *K. subulatus* Molin, 1861, redescrita por Schad, em 1962.

Por nós, *K. subulatus* foi encontrado em *Boa constrictor constrictor*, em *Epicrates cenchria cenchria* e em *Corallus caninus;* todas essas serpentes provieram da região amazônica.

De acordo com o ponto de vista exposto no trabalho, desde que *K. i. coronellae* e *K. subulatus* se confundam morfologicamente e desde que suas áreas de dispersão se sobreponham, em parte pelo menos, é de se prever que *K. i. coronellae* e *K. subulatus* sejam sinônimos. Verdadeira esta hipótese o parasitismo de *K. subulatus,* que é uma espécie sul americana e centro americana, devendo atingir o México, não se restringirá a serpentes *Boidae.*

UNITERMOS: *Kalicephalus subulatus. Nematoda, Diaphanocephalidae.* Morfologia. Incidência. Ofídios.

INTRODUÇÃO

Schad, em 1962, redescreve a espécie *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861; no momento, utilizando material colhido por nós, podemos confirmar a descrição de Schad, embora existam algumas divergências, por exemplo a presença de "coronula radiata" no interior da cápsula bucal, negado por Schad.

A redescrição de Schad tornou-se possível com o exame do material colhido por Natterer e do qual se serviu Molin, para sua publicação. A descrição original de Molin não permite, por si apenas, o reconhecimento de *K. subulatus.* Possivelmente esta composição específica deveria se tornar "nomen nudum",

* Trabalho executado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP.
Endereço para correspondência: Caixa postal 4.365 - São Paulo - Brasil

não fosse a iniciativa de Schad e a existência do material colecionado por Natterer.

Schad, em sua monografia sobre calicéfalos (1962), procurou solucionar a sistemática desse gênero, no qual se enumeram cinqüenta espécies (Yamaguti, 1961), número que Schad reduz a vinte e quatro, embora mantendo e criando sub-espécies.

Não obstante, parece-nos que o gênero *Kalicephalus* Molin, 1861 ainda apresenta dúvidas quanto às espécies que o compõem. Tal situação é natural pelos motivos seguintes: 1) Distribuição universal e contínua dos calicéfalos; 2) Uniformidade anatômica impressionante das diferentes espécies; 3) Frouxa especificidade parasitária; isto é, determinado calicéfalo é, freqüentemente, encontrado em várias espécies de ofídios.

No caso do *K. subulatus*, Schad afirma ser este nematóide específico de *Constrictor constrictor* (=*Boa constrictor*) e declara ter encontrado dezesseis coleções do parasito, sendo doze de *C. constrictor* do U.S.N.M., uma de *C. constrictor* do Zoológico do Rio de Janeiro, duas de *C. constrictor imperator* (respectivamente do National Zoological Park (U.S.A.) e de Santa Rosa (Guatemala), além do material tipo, oriundo do Estado do Mato Grosso (Brasil).

Os herpetologistas tendem para considerar *Constrictor* sinônimo de *Boa;* Stimson (1969), em seu catálogo, refere-se a espécie *Boa constrictor* com as seguintes sub-espécies:

Boa constrictor constrictor
Leste do Equador, norte e leste do Peru, norte da Bolívia; Brasil, ao norte do Paralelo 13.°5; Colômbia central e oriental; Venezuela; Guianas; Trinidade e Tobago.

Boa constrictor amarali
Bolívia oriental; Brasil, desde os estados de Mato Grosso e Goiás, para o sul, até São Paulo.

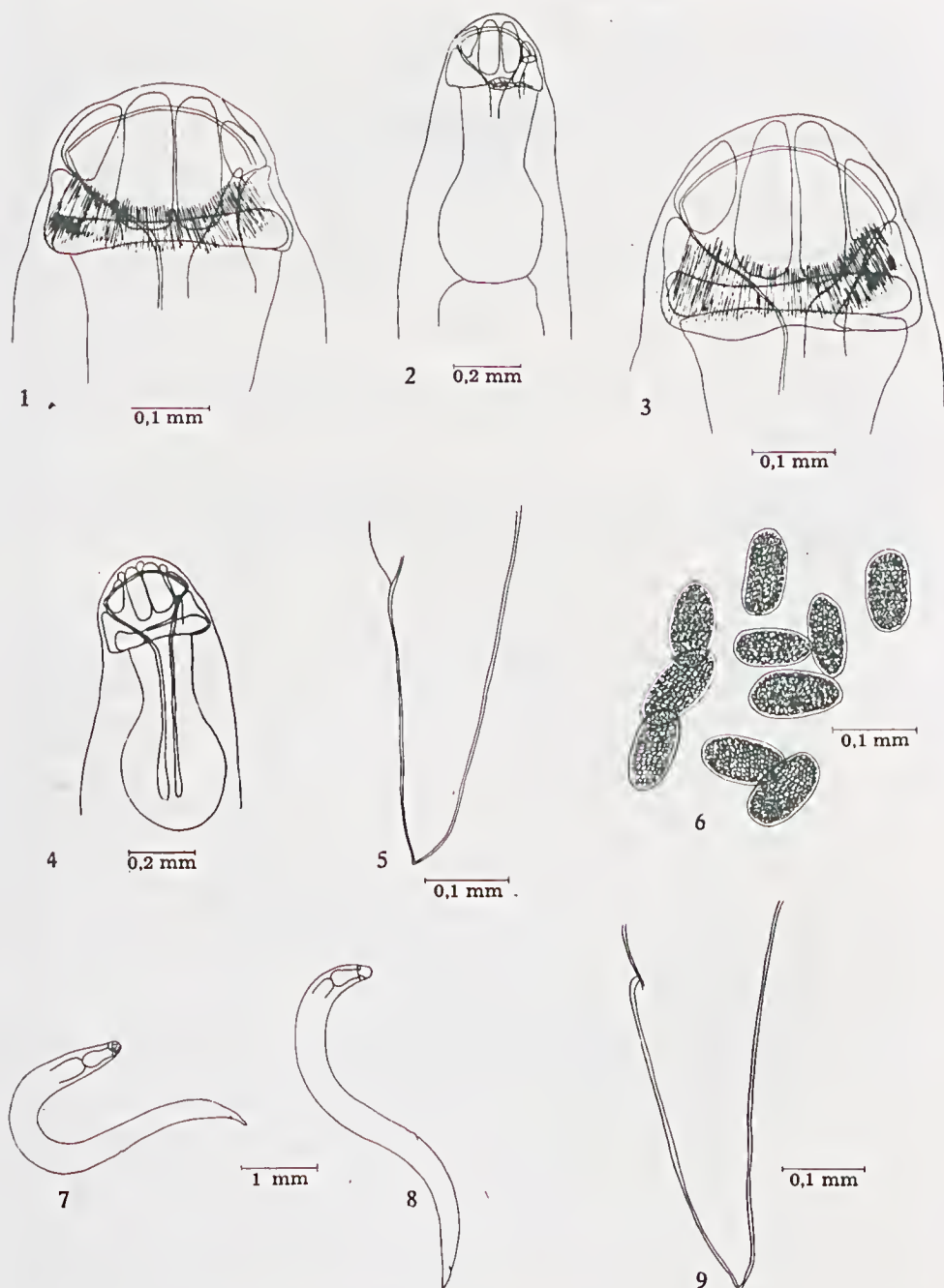
Boa constrictor imperator
Norte de Sonora e Taumalipas central, México, para o sul através da América Central ao noroeste e oeste do Equador e noroeste do Peru.

Boa constrictor nebulosa
Dominica, Pequenas Antilhas.

Boa constrictor occidentalis
Paraguai e Argentina entre os Andes e o Rio Paraná, para o sul até as províncias de Córdoba, San Luis e Mendoza.

Boa constrictor orophias
Santa Lúcia, Pequenas Antilhas.

Boa constrictor ortoni
Noroeste do Peru.

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975

PRANCHA I - *Kalicephalus subulatus*. Material proveniente de *Boa constrictor constrictor*: 1 e 3 - Extremidade cefálica de fêmea. 2 e 4 - Extremidade anterior de fêmea. 5 e 9 - Extremidade caudal de fêmea. 6 - Ovos desenhados, quando ainda na cavidade uterina. 7 e 8 - Desenho total de fêmea.

OBS.: Chama-se a atenção para a "coronula radiata" interna cefálica, bem observada em todos os calicéfalos que temos examinado. Tal particularidade não é mencionada por Schad.

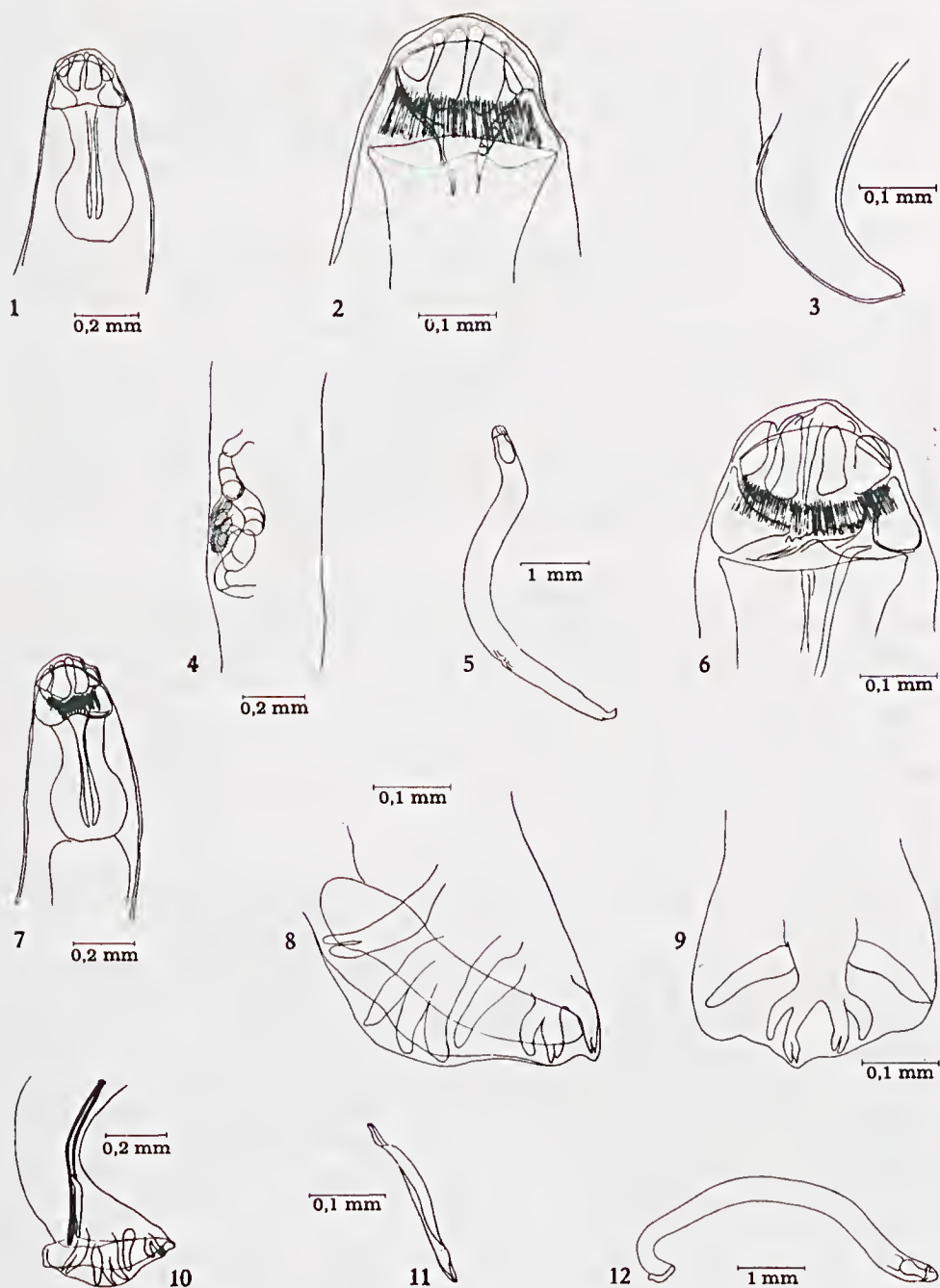
Diante desta situação, deveríamos modificar a maneira de dizer de Schad e admitir que *K. subulatus* seria encontrado em várias subespécies de *B. constrictor*. Entretanto, a especificidade de *K. subulatus* é ainda mais frouxa, como prova seu encontro em dois exemplares de *Epicrates cenchria cenchria* e em um exemplar de *Corallus caninus* (=*Boa canina*). Portanto, até que outras verificações ocorram, devemos ter como certo que *K. subulatus* é parasito de serpentes da família *Boidae*, gêneros *Boa, Epicrates* e *Corallus*. Ademais, desde que a área de distribuição de *K. subulatus* se superponha, pelo menos em parte, a de *K. inermis coronellae* e sendo este calicéfalo anatomicamente igual a *K. subulatus* avoluma-se a dúvida da validade da subespécie de Ortlepp. Confirmada esta hipótese, deixará de ser válida a relativa especificidade do calicéfalo em causa, como parasito de boideos.

Motivos dessa ordem obrigam-nos a cautelas; é a razão de, neste trabalho, nos alongarmos mais do que aparentemente necessitaria a simples comparação de um nematóide.

Molin (1861), utilizando-se do material colhido no Brasil pelo viajante e naturalista Natterer, depositado no Museu de História Natural de Viena, redescreveu, entre outras espécies do gênero, o *Kalicephalus subulatus*.

Transcrevemos na íntegra a descrição de Molin:

> "Caput cupaeforme, anulo corneo interno e reliquo corpore discretum, fulcris interne suffultum, diaphanum; os terminale, bivalve, amplum, limbo lineari diaphano papilloso; corpus semicirculariter inflexum, subcylindricum, retrorsum sensim attenuatum; extremistas caudalis maris bursa genitali terminali integra, oblique truncata, radio dorsali diramato hinc bis tripartito, fasciculisque lateralibus quadriradiatis radio primo bifido, ex qua epistomium retractile; penis duplex, cruribus longis filiformibus utrinque alis alinearibus; vagina penis simplex, longa, valida, in curva; extremistas caudalis feminae subulata; anus apici caudali haud proximus; apertura vulvae in apice papillae conicae valve prominulae posterioris corporis partis; uterus bicornis. Longit. mar. 0,005-0,009; crassit. 0,0002-0,0003. Longit. fem. 0,006-0,013; crassit. 0,0004-0,0005."
>
> "Hospedeiros: *Lachesis rhombeata*: no esôfago e no ventrículo, julho; no ventrículo e no delgado, junho, Borba; *Bothrops jararaca*, julho, Ipanema; *Boa constrictor*, abril, Mato Grosso; por todo o intestino."
>
> Observação: Eu tive oportunidade de examinar da referida espécie: "1) 15 machos e 36 fêmeas muito bem conservados e perfeitamente transparentes encontrados na maior parte aderentes ao esôfago mas em parte também no estômago de um *Lachesis rhombeata* macho, que também abrigava 32 pequenos Pentastomos em parte aderentes ao pulmão e em parte fixados às paredes do grande saco aéreo, ainda 3 longos Cestoides inteiros e 2 curtos sem cabeça com 6 fragmentos no intestino. Mais 12 machos e 16 fêmeas achados no estômago e no delgado de um outro réptil macho da mesma espécie igualmente de Borba, em 28 de junho de 1830. Esta continha ainda 5 fragmentos de um longo nematóide e 1 outro nematóide longo no delgado."

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975.

PRANCHA II - *Kalicephalus subulatus*. Material proveniente de *Boa constrictor constrictor*: 1 - Extremidade anterior de fêmea. 2 - Extremidade cefálica de fêmea. 3 - Extremidade caudal de fêmea. 4 - Porção terminal da genitália de fêmea. 5 - Desenho total de fêmea. 6 - Extremidade cefálica de macho. 7 - Extremidade anterior de macho. 8 - Bolsa copuladora, vista lateral. 9 - Raia dorsal. 10 - Espículos e bolsa copuladora, vista lateral. 11 - Gubernáculo. 12 - Desenho total de macho.

> "2) 1 macho e 1 fêmea encontrados no ato da copula no intestino de *Bothrops jararaca* macho, que ainda continha Pentastomos no pulmão e na cavidade abdominal, e vermes semelhantes a Ligulas no ventre entre os músculos e as costelas, em 27 de julho de 1819."
> "3) Finalmente 2 machos e 5 fêmeas recolhidos juntamente com 1 Equinorinco livre no intestino de um *Boa constrictor* macho, em 7 de abril de 1828."

A observação de Molin, acima transcrita, é desacompanhada de desenhos que permitam o perfeito conhecimento de *K. subulatus*, como de outros calicéfalos descritos nessa ocasião. Esta falha, desvaloriza acentuadamente o trabalho de Molin, no capítulo pertinente ao gênero *Kalicephalus*, no qual oferece desenhos (aliás muito imperfeitos) de uma única espécie, *K. inermis*. Com descrições que não oferecem elementos seguros para a identificação das espécies por ele criadas, Molin motivou um impasse de real envergadura aos helmintologistas interessados nas espécies sul americanas dos calicéfalos. Na verdade, os especialistas brasileiros, inclusive Lauro Travassos, sempre se sentiram sem condições para estudar a situação dos nematóides do gênero *Kalicephalus*, ante a impossibilidade de reconhecer as espécies de Molin, mal definidas na monografia daquele pesquisador.

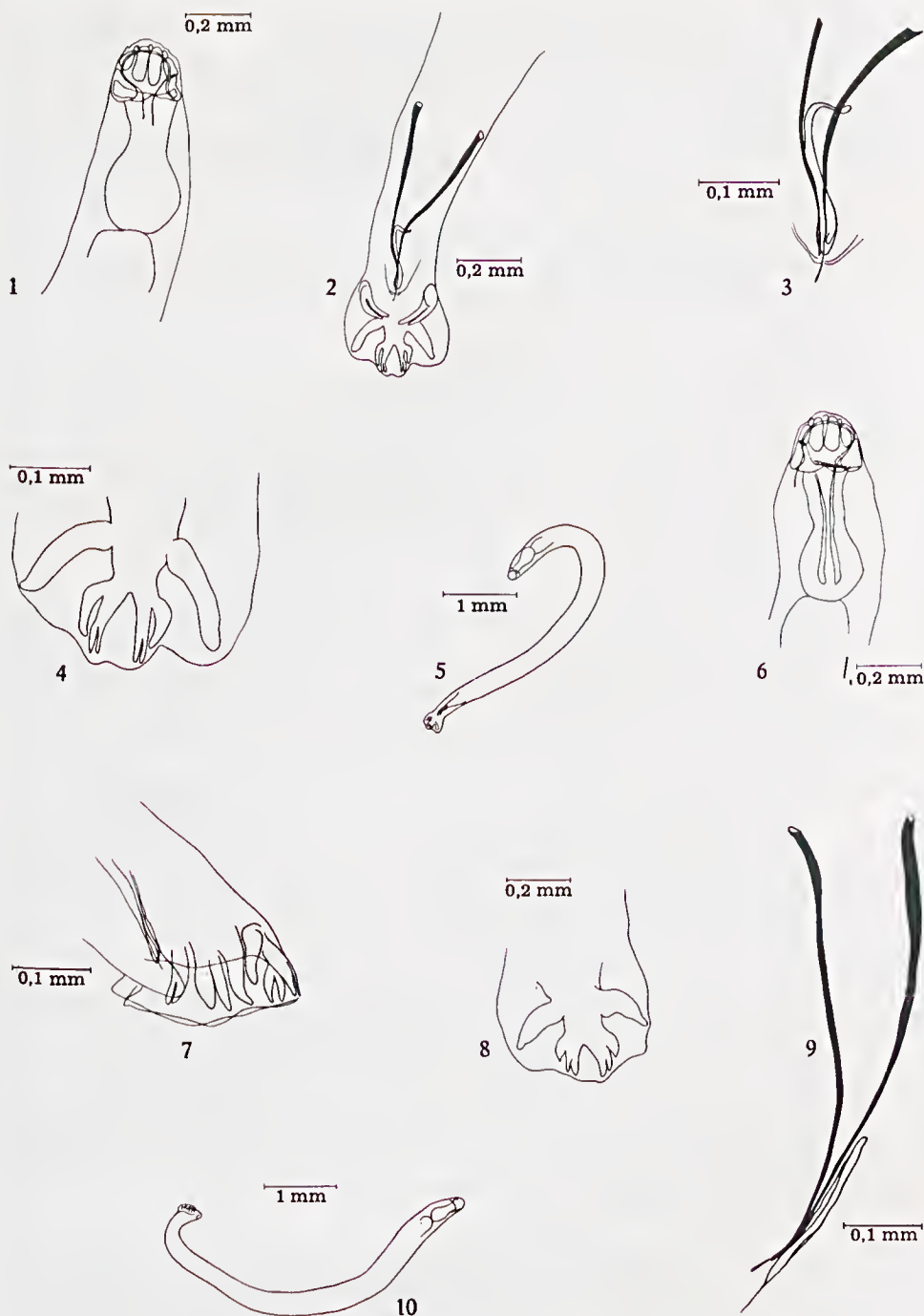
Tornava-se necessária a revisão do material de Natterer, para um exato conhecimento dos tipos de Molin. Tal oportunidade coube ao pesquisador canadense G.A. Schad, que, em 1962, publicou uma minuciosa revisão dos calicéfalos de todo o mundo, contando, para a execução de tal tarefa, com a colaboração de grandes institutos, museus, zoológicos e outras organizações de vários continentes que lhes forneceram imenso e precioso acervo de calicéfalos. Schad reviu os tipos de Molin; agora baseados no seu depoimento, encontramos condições, até então inexistentes, para uma apreciação razoável sobre as espécies de *Kalicephalus* sul americanos.

Vimos, há meses, procurando calicéfalos em ofídios brasileiros, já tendo conseguido uma boa coleção, com 381 coletas positivas, conseguidas em serpentes venenosas e não venenosas, tendo sido feitas 1.444 necrópsias.

Somente cinco serpentes, todas elas da família *Boidae*, provenientes da região amazônica apresentaram o calicéfalo em apreço, sendo que uma delas (necrópsia n.º 3211), *Boa constrictor constrictor*, oriunda do Marabá (Pará) apresentava-se parasitada por *K. subulatus* (10 fêmeas e 4 machos), *K. inermis* (2 fêmeas e 2 machos e uma fêmea de um calicéfalo com cabeça desviada do eixo de simetria corporal (*K. appendiculatus*?). Já necropsiamos doze giboias da região sul do Brasil (*Boa constrictor amarali*); até agora, resultou negativo o encontro de *K. subulatus* em boideas da região sul do país. Temos, pois, razões para presumir que *K. subulatus* começa a aparecer na região amazônica e que sua zona de dispersão se expande para o norte.

Nas necrópsias números 2422, 3211, 3212, 3218 e 3275 nos deparamos com um calicéfalo que, morfologicamente se situa nas características que Schad reestabeleceu para *K. subulatus*. Entretanto, nossa verificação põe em choque a afirmativa categórica de Schad, de que a espécie em apreço é parasita extrito de giboia (*Constrictor constrictor*), pelo fato de nossos espécimes terem sido encontrados em *Epicrates cenchria cenchria* e *Corallus caninus*, além de *Boa constrictor constrictor*.

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975.

0,2 mm
1
2
0,2 mm
0,1 mm
3
0,1 mm
4
1 mm
5
6
0,2 mm
0,1 mm
7
0,2 mm
8
9
0,1 mm
1 mm
10

PRANCHA III - *Kalicephalus subulatus*. Material proveniente de *Boa constrictor constrictor*: 1 e 6 - Extremidade anterior de macho. 2 - Bolsa copuladora, espículos e gubernáculo. 3 e 9 - Espículos e gubernáculo. 4 e 8 - Raia dorsal. 5 e 10 - Desenho total de macho. 7 - Bolsa copuladora, vista lateral.

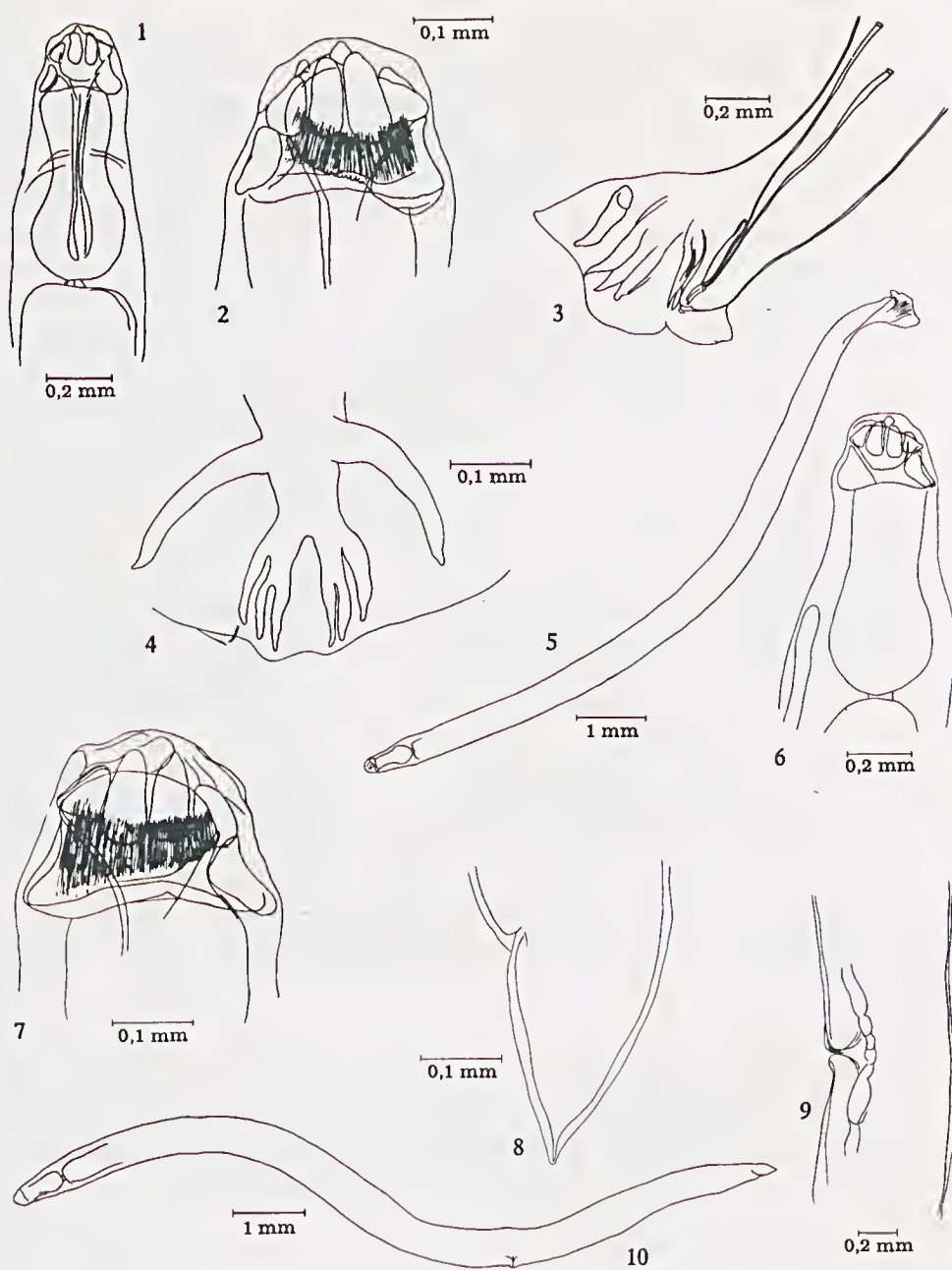
CONCEITO DE *KALICEPHALUS SUBULATUS*, SEGUNDO SCHAD.

O que está acima exposto, impõe a análise do trabalho de Schad, quando focaliza *Kalicephalus subulatus*.

Primeiramente, transcreveremos a exposição do autor canadense; a seguir, discutiremos o assunto.

> "Diagnose morfológica de *K. subulatus*
>
> Integrante do grupo *inermis;* cutícula cervical não inflada; raias laterais digerventes; raia dorsal do tipo III; restrita a *Constrictor constrictor*.
>
> Descrição: Caliccéfalo relativamente curto e grosso (stout). Face arqueada, ligeiramente voltada dorsalmente. Anel quitinóide anterior largo. Cantos cutilares inflados muitas vezes irregulares. Goteira dorsal com ou sem curva anterior. Peça posterior ventral um tanto triangular, peça posterior dorsal arredondada. Esôfago robusto, largo anteriormente, estreitando de repente para formar o bulbo. Poro excretor e papilas cervicais usualmente na área do bulbo esofagiano mas ocasionalmente pós-esofagiano.
>
> Fêmea: Vulva perto do início do terço posterior do corpo, lábios apenas ligeiramente salientes, muitas vezes numa depressão escavada. Anfidelfica, ovejectores curtos, grossos. Alças ovarianas enoveladas anteriormente ao útero anterior. Cauda estreita, alongada; lábio posterior do anus geralmente mais proeminente que o anterior (Fig. 98).
>
> Macho: Raias ventrais da bolsa acoladas na maior extensão de seu comprimento, separadas apenas nas extremidades. Laterais com um tronco comum. A externolateral destacada desde a base, mais romba, mais policiforme. Extremidades das laterais regularmente espaçadas. Raia dorsal do tipo III. Espículos longos, alados, com extremos alongados e espatulados. Gubernáculo com apêndice (addendum) posterior cordiforme e proeminente telamon."
>
> Discussão: O nome *Kalicephalus subulatus* é aqui restringido à espécie ocorrendo em *Boa constrictor, Constrictor constrictor*. O material original de Molin é heterogêneo, consistindo em *K. subulatus* de *C. constrictor* e uma outra espécie de *Bothrops* e *Lachesis*. Os espécimes na coleção 4232 do Naturhistorisches Museum, Viena, são sintipos dos quais nenhum lectotipo foi selecionado desde que os espécimes são tão quebradiços (brittle) que nem um único exemplar poderá resistir incolume a maior reexame.
>
> Todas as 15 coleções estudadas deste hospedeiro são claramente coespecíficas. Nenhum outro caliccéfalo foi encontrado em serpentes que fossem seguramente *C. constrictor* nem foi nenhum *K. subulatus* observado em *Bothrops* ou *Lachesis*. Parece portanto, que *K. subulatus* é hóspede específico, e que a restrição acima proposta é justificável. Tal circunstância também admite checar redescrições e informes de Ortlepp (1923), Stiles e Hassal (1894), Caballero e Vogelsang

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
0,1 mm 0,2 mm 1 mm

PRANCHA IV - *Kalicephalus inermis*. Material proveniente de *Boa constrictor constrictor*: 1 - Extremidade anterior de macho. 2 - Extremidade cefálica de macho. 3 - Bolsa copuladora, espículos e gubernáculo, vista lateral. 4 - Raia sorsal (tipo IV de Schad). 5 - Desenho total de macho. 6 - Extremidade anterior de fêmea. 7 - Extremidade cefálica de fêmea. 8 - Extremidade caudal de fêmea. 9 - Porção terminal da genitália de fêmea. 10 - Desenho total de fêmea.

OBS.: Esta prancha é apresentada como comprovação do poliparasitismo de *Boa constrictor constrictor*.

(1950), e Herman (1939), disso resultando um mínimo de confusão." *K. chitwoodi* Caballero, 1954, é posto na sinonímia de *K. subulatus* desde que um espécime macho e outro fêmea presenteados pelo Dr. Caballero se enquadram no rígido conceito de *K. subulatus*. *Strongylus boae* Mac Calium foi posto na sinonímia de *K. boae* (Blanchard) por Harwood (1932). Eu examinei um preparado (USNM 35409) com dois espécimes de Mac Callum de *C. constrictor* e eles são *K. subulatus*. Deve, entretanto, ser notado que o material de Mac Callum era heterogêneo. Seus calicéfalos de hospedeiros norte americanos e de *Python sebae*, que foram rotulados como *K. boae*, são certamente outras espécies. Embora não seja aparente através das diagnoses, pelas quais a distinção entre *K. subulatus* e *K inermis* depende essencialmente do hospedeiro, existe considerável diferença na morfologia. Isto é especialmente real quando são simpátricos. Dentro da área (range) de *K. subulatus*, *K. inermis* tem a raia dorsal com suas ramificações terminais associadas em dois grupos palmados, e os pares mais internos dessas ramificações são longos.

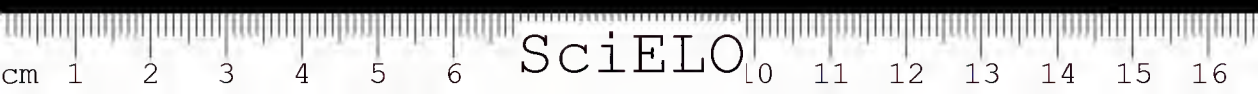
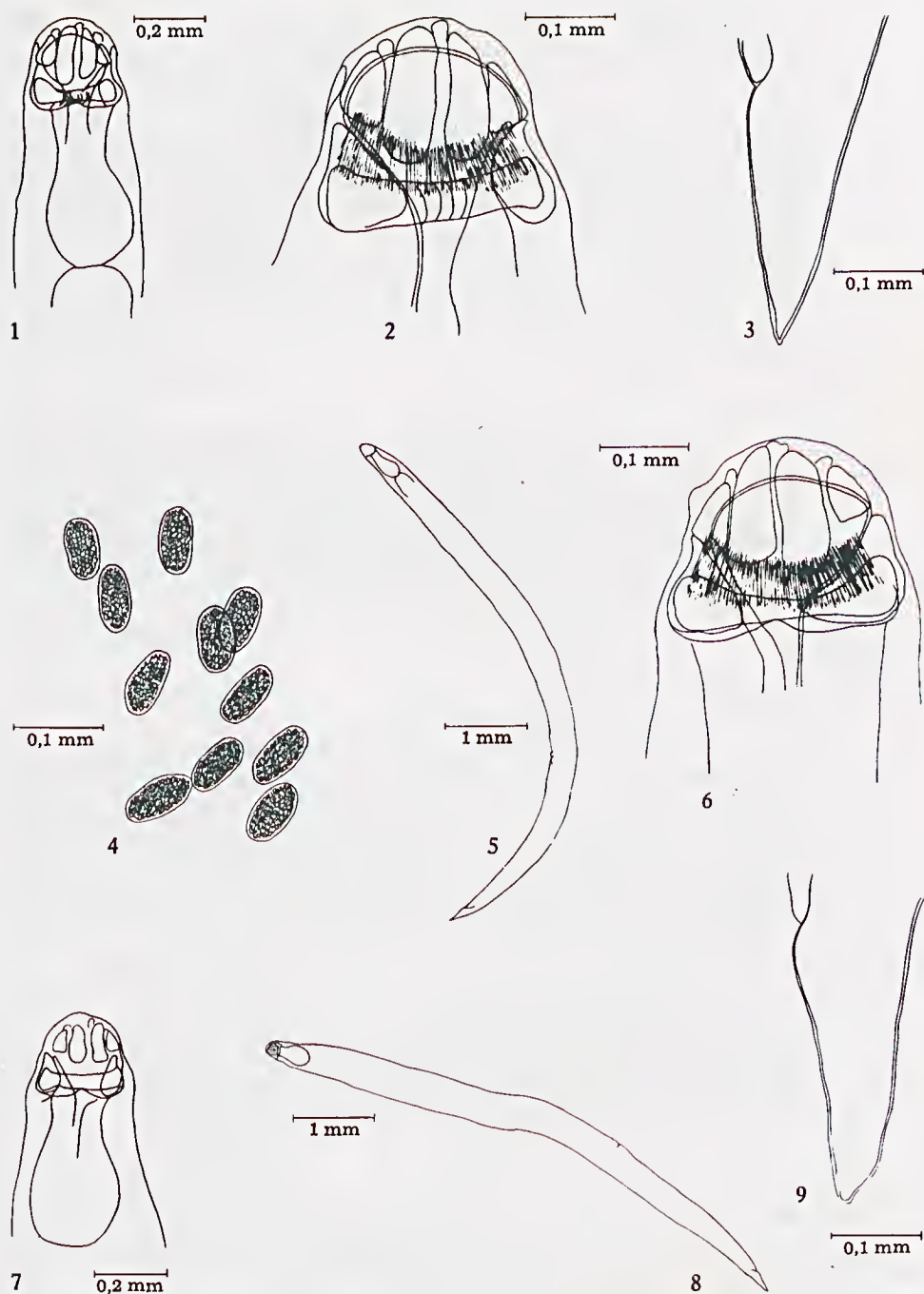
Para o norte da área de *K. subulatus*, a subespécie *K. inermis coronellae* tem uma raia dorsal igual a de *K. subulatus*. As ramificações terminais são separadas e os pares mais internos dessas ramificações são curtos. Liminarmente, as caudas das fêmeas de *K. subulatus* e *K. inermis* diferem fortemente quando as espécies são simpátricas, enquanto que a cauda do alopátrico *K.i. coronellae* se assemelha a de *K. subulatus*. *K. subulatus* difere de *K.i. coronellae* no contorno da face, no fortemente desenvolvido reborbo quitinóide anterior e no esôfago (compare medidas e figuras)."

Julgamos prudente transcrever o relato de Schad pertinente a *K. subulatus*, para desenvolver as considerações relativas ao assunto, que a nosso ver merece alguns reparos.

KALICEPHALUS SUBULATUS, 1861 (Segundo nosso entendimento)

As espécies de *Kalicephalus*, decididamente sul americanas admitidas por Schad, podem ser distinguidas pelos caracteres apresentados na seguinte chave, cujos dados são os oferecidos na publicação daquele pesquisador.

a) Espécies anfidelfas:

1) Com a extremidade cefálica terminando em ponta ou fortemente arredondada; cabeça dirigida para a frente ou apenas ligeiramente desviada para o lado dorsal. Esôfago longo, mais largo anteriormente do que na região bulbar. Fêmeas com a vulva proeminente, pendunculada, podendo estar situada em depressão escavada; situa-se no terço posterior do corpo. Ovejectores bem desenvolvidos; úteros opostos; cauda curta forte, terminando em ponta, com espinho curto. Ma-

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975.

PRANCHA V - *Kalicephalus subulatus.* Material proveniente de *Boa constrictor constrictor:* 1 - Extremidade anterior de fêmea. 2 - Extremidade cefálica de fêmea. 3 - Extremidade caudal de fêmea. 4 - Ovos desenhados, quando ainda na cavidade uterina. 5 - Desenho total de fêmea. 6 - Extremidade cefálica de macho. 7 - Extremidade anterior de macho. 8 - Desenho total de fêmea. 9 - Extremidade caudal de fêmea.

chos com a bolsa copuladora ampla. Raia dorsal do tipo IV-V, sendo a sub-ramificação interna a mais longa.

K. inermis

2) Calicéfalos parasitas específicos de *C. constrictor* (giboia). Face arqueada, ligeiramente voltada para o lado dorsal. Esôfago robusto, mais estreito anteriormente do que na região bulbar. Fêmeas com a vulva situada na porção inicial do terço posterior do corpo e com lábios apenas salientes, às vezes em depressão escavada; cauda estreita, longa, sem espinho apical; lábio posterior do anus via de regra mais proeminente que o anterior. Machos com a raia dorsal do tipo III.

K. subulatus

3) Calicéfalos localizados no reto das serpentes suas hospedeiras. Face dirigida para a frente; esôfago mais estreito anteriormente do que na região do bulbo. Fêmeas com a vulva situada na metade posterior do corpo, relativamente em situação mais anterior que as duas espécies já referidas; cauda brevicônica, sem espinho terminal. Machos com a raia dorsal do tipo II.

K. rectiphilus rectiphilus

b) Espécies prodelfas:

1) Calicéfalos caracterizados por apresentarem a cápsula bucal assimétrica e a face nitidamente voltada para o lado dorsal. Fêmeas com a vulva no último quarto do corpo, frequentemente pendunculada. Genitália feminina prévulvar; cauda curta, podendo apresentar dilatação pré-terminal. Machos com a raia dorsal freqüentemente curta e reforçada, externo dorsais robustas; complexo dorsal do tipo III — II.

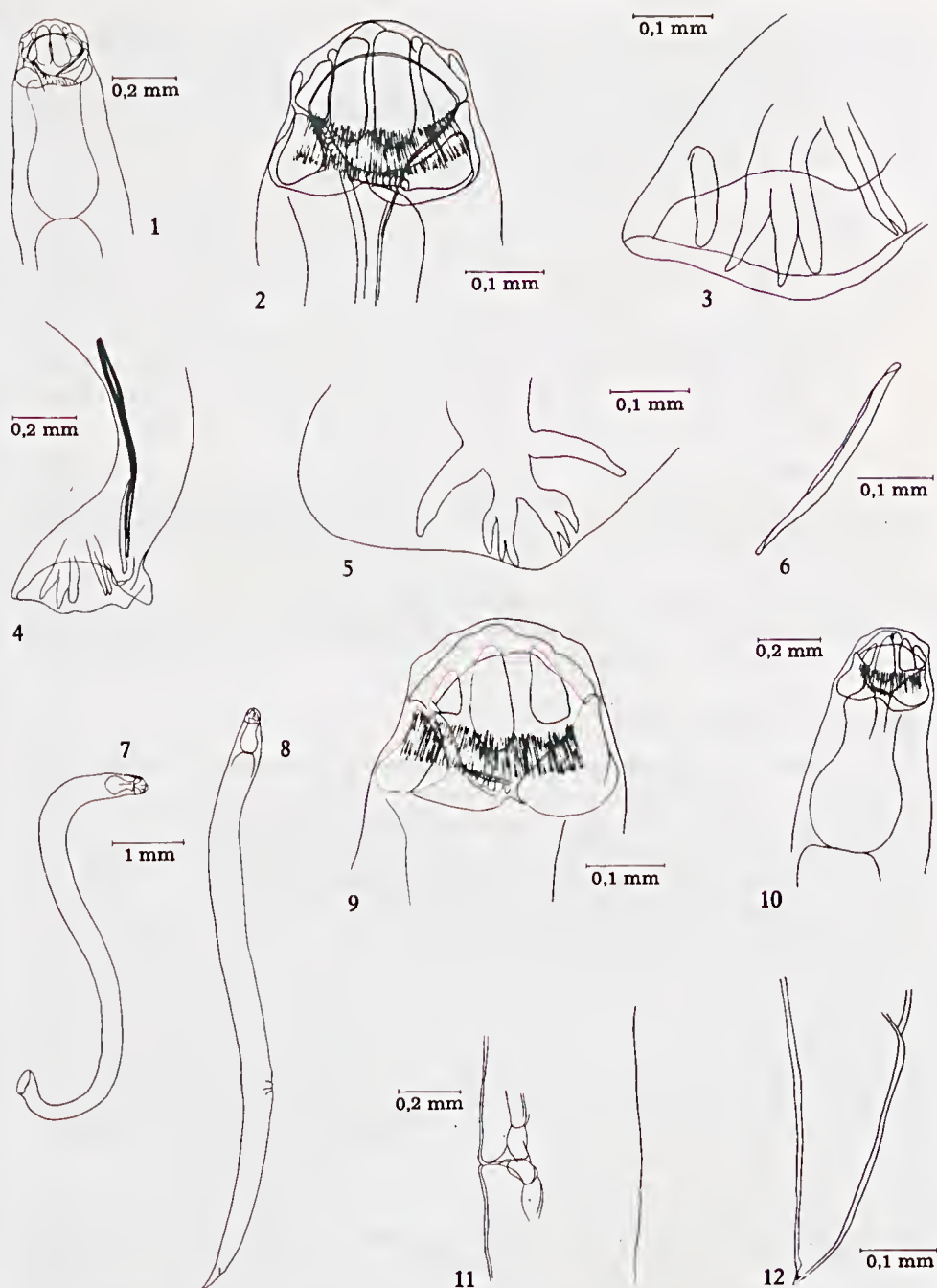
K. appendiculatus

2) Cápsula bucal simétrica. Face dirigida para a frente. Fêmeas com a vulva no quarto posterior do corpo; vulva penduneulada, formando proeminente corcova; cauda brevicônica, com robusto espinho terminal. Machos com a raia dorsal do tipo III.

K. costatus

O calicéfalo encontrado nas necrópsias n.º 2422, 3211, 3212, 3218 e 3275, deve ser, por suas características morfológicas, identificado a *K. subulatus;* as cobras que o continham foram respectivamente:

Necrópsia n.º 2422 — *Epicrates cenchria cenchria,* macho; procedência, Vale do Guaporé (Estado do Acre); material colhido em 24/09/74; vermes localizados no intestino médio, encontrados dois machos e duas fêmeas. A serpente foi sacrificada e necrópsia efetuada logo após.

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975.

PRANCHA VI - *Kalicephalus subulatus*. Material proveniente de *Boa constrictor constrictor*: 1 - Extremidade anterior de macho. 2 - Extremidade cefálica de macho. 3 - Bolsa copuladora; vista lateral. 4 - Bolsa copuladora, espículos e gubernáculo; vista lateral. 5 - Raia dorsal. 6 - Gubernáculo. 7 - Desenho total de macho. 8 - Desenho total de fêmea. 9 - Extremidade cefálica de fêmea. 10 - Extremidade anterior de fêmea. 11 - Porção terminal da genitália de fêmea. 12 - Extremidade caudal de fêmea.

Necrópsia n.º 3211 — *Boa constrictor constrictor;* procedência, Marabá (Estado do Pará); material colhido em fevereiro de 1975; vermes localizados no intestino delgado; encontrados 29 exemplares; sendo uma fêmea de cabeça torta (*K. appendiculatus?*); quatro machos e dez fêmeas, com caractéres de *K. subulatus;* dois machos e duas fêmeas, com caractéres de *K. inermis.*

Necrópsia n.º 3212 — *Epicrates cenchria cenchria,* fêmea; procedência Marabá (Estado do Pará); material colhido em fevereiro de 1975; vermes localizados no intestino médio; encontrados dois exemplares machos.

Necrópsia n.º 3218 — *Boa constrictor constrictor;* procedência Manaus (Estado do Amazonas); material colhido em março de 1975; vermes localizados no intestino médio; encontrados dezoito machos e vinte e quatro fêmeas.

Necrópsia n.º 3275 — *Corallus caninus* (=*Boa canina*); procedência Marabá (Estado do Pará); material colhido em abril de 1975; vermes localizados no intestino médio; encontrados dois exemplares fêmeos.

Passamos a descrever o nematóide por nós classificado como *K. subulatus* e, em seguida, faremos a comparação do nosso material com os dados apresentados por Schad para a espécie em foco.

Kalicephalus subulatus Molin, 1861

Nematóide de tamanho pequeno, relativamente a outros calicéfalos (*K. inermis*, por exemplo atinge o triplo do comprimento de *K. subulatus*). A cabeça é típica de um calicéfalo; face ligeiramente arredondada e dirigida para a frente; presentes peças quitinóides em cada valva bucal; peça lateral posterior ventral triangular; peça lateral posterior dorsal também tendendo para a forma de triângulo, porém com os ângulos acentuados. Goteira dorsal bem destacada. No fundo da cápsula bucal uma franja a moda de uma "coronula radiata" interna (esta formação está rigorosamente presente em todos os calicéfalos por nós observados; é estranho que Schad não assinale em nenhuma das espécies brasileiras tal formação, que é facilmente observada). Eventualmente, verifica-se no prolongamento da goteira dorsal a presença de rugosidades. Esôfago relativamente curto; o esôfago é ligeiramente menos largo, em seu início, do que o bulbo; estreita-se a seguir para formar um ístmo curto e depois expande-se no bulbo esofagiano. Poro excretor situado na altura da dilatação bulbar. Papilas cervicais, difíceis de se observar, situadas na mesma região do poro excretor.

Fêmea: Vulva situada no terço posterior do corpo; lábios da vulva apenas salientes; úteros opostos, genitália tipicamente anfidelfa. Ovos bastante numerosos e já morulados na ocasião da oviposição, são de casca delgada. A cauda da fêmea atenua-se progressivamente e é relativamente longa, do tipo subulado; na abertura anal observa-se que o lábio posterior é ligeiramente mais pronunciado; não existe espinho terminal caudal.

Macho: Bolsa copuladora campânulada e regularmente ampla; raias ventrais bem separadas do grupo lateral e fendidas apenas na porção terminal. Grupo lateral nascendo de um tronco único; a antero-lateral, mais curta, tem a ponta

arredondada e dirige-se para diante; a médio e a postero lateral dirigem-se para trás e são independentes. A raia dorsal é do tipo III (sistematização de Schad, 1961). Espículo e gubernáculo bem quitinisados; os espículos não são longos; delgados, vão se afilando progressivamente e terminam em ponta, são iguais; o gubernáculo apresenta-se como uma cunha estreita longa, com a parte proximal mais larga; não verificamos a existência de telamon.

Foram medidos e desenhados 2 machos e 2 fêmeas da necrópsia n.º 3211, 1 macho da necrópsia n.º 3212, 2 machos e 4 fêmeas da necrópsia n.º 3218, 2 machos e 3 fêmeas da necrópsia n.º 2422 e 2 fêmeas da necrópsia n.º 3275. Desenhos, feitos com auxílio de câmara clara, acompanham este trabalho.

Oferecemos medidas de 11 fêmeas e 7 machos (Tabela n.º 1).

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os calicéfalos, grupo genérico de dispersão mundial, caracterizam-se por sua uniformidade anatômica, seja qual for sua procedência; por isso as características definidoras de diferentes espécies, eventualmente, não são de impressionar. De outro lado, há a circunstância de tais nematóides apresentarem, via de regra, uma frouxa especificidade parasitária, a mesma espécie sendo encontrada em diferentes ofídios.

Diante de tal situação, não é de estranhar o fato de Yamaguti (1961) apresentar uma lista de cinqüenta espécies e, logo a seguir, Schad (1962), ao fazer a revisão taxonômica do gênero, reduzí-la a vinte e quatro espécies e subespécies.

Três autores interessaram-se de modo particular por uma apreciação crítica dos dados anatômicos usados para a diferenciação dos diferentes calicéfalos (Hsu, 1934, Campana-Rouget, 1950 e Schad, 1962). Pelo que dizem esses autores, bem como pela apreciação dos diferentes calicéfalos, verifica-se que são poucas as espécies que se identifiquem por um determinado caracter de maior imponência. É o caso de *K. megacephalus* Schad, 1961, individualizado pelo volume cefálico; o de *K. longispicularis* Schad, 1961, que se destaca pelo comprimento dos espículos; ou o da espécie sul americana *K. appendiculatus* Molin, 1861, que se reconhece pela cápsula bucal assimétrica. Nas outras espécies "brasileiras" não encontramos elementos tão marcantes de diferenciação; isso explica a razão de ter Schad reduzido a cinco os calicéfalos da região brasileira, que na listagem de Yamaguti são oito.

Pelo exame da chave simplificada das espécies brasileiras, aceitas por Schad, presente neste trabalho e totalmente baseada em dados colhidos na monografia desse autor, há dois grupos de calicéfalos "nacionais": o das espécies prodelfas (incluindo *K. appendiculatus* e *K. costatus*) e o das espécies anfidelfas (incluindo *K. inermis, K. subulatus* e *K. rectiphilus neorectiphilus*). A individualização das espécies nesses grupos obedece essencialmente a características anatômicas, como situação da vulva, conformação da cauda nas fêmeas, tamanho relativo do esôfago, torção cefálica (*K. appendiculatus*), estrutura da raia dorsal nos machos. Apenas *K. subulatus* apresentaria um caracter de natureza biológica: o de parasitar exclusivamente *C. constrictor*.

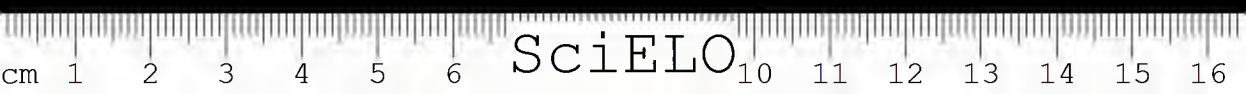



TABELA 1

Medidas de *Kalicephalus subulatus* (em mm)

necró-	Espécimes fêmeos											Espécimes machos						
psias	3218				3211		2422			3275		2422		3211		3218		3212
N.º	A	B	C	D	A	B	A	B	C	A	B	A	B	A	B	A	B	A
T.T	3,22	8,44	7,04	7,29	5,49	5,08	7,01	7,67	6,80	8,16	8,48	6,04	6,18	4,89	5,88	6,0	6,86	5,27
L.M	0,45	0,48	0,43	0,36	0,41	0,41	0,43	0,43	0,43	0,45	0,39	0,31	0,34	0,30	0,34	0,30	0,32	0,27
EA-V	5,42	5,43	4,50	4,73	3,45	3,26	4,63	4,70	4,47	5,32	5,58	—	—	—	—	—	—	—
V-A	2,52	2,71	2,78	2,30	1,78	1,60	2,09	2,50	2,06	2,84	2,60	—	—	—	—	—	—	—
Cauda	0,28	0,30	0,26	0,26	0,26	0,22	0,29	0,47	0,27	0,30	0,30	—	—	—	—	—	—	—
V-EP	2,80	3,01	2,54	2,56	2,04	1,82	2,38	2,97	2,33	2,82	2,90	—	—	—	—	—	—	—
R.V	1,93	1,80	1,77	1,84	1,69	1,79	1,94	1,58	1,91	1,88	1,92	—	—	—	—	—	—	—
	—	—	—	0,076	—	—	0,086	0,078	—	0,068	0,068	—	—	—	—	—	—	—
Ovos				x			x	x		x	x							
	—	—		0,040	—	—	0,047	0,048	—	0,041	0,042	—	—	—	—	—	—	—
C.E	0,35	0,51	0,45	0,46	0,60	0,61	0,44	0,46	—	0,48	0,47	0,40	0,45	0,43	0,42	0,42	0,44	0,39
LME	0,26	0,30	0,25	0,25	0,32	0,31	0,27	0,29	—	0,28	0,24	0,23	0,23	0,23	0,19	0,25	0,23	0,24
PCB	0,32	0,23	0,20	0,24	0,25	0,22	0,18	0,21	—	0,24	0,21	0,20	0,20	0,18	0,11	0,19	0,21	0,17
LMCB	0,52	0,33	0,30	0,30	0,36	0,34	0,28	0,32	—	0,28	0,28	0,28	0,27	0,24	0,26	0,25	0,26	0,25
Esp.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,57	0,58	0,59	—	—	—	0,54

T.T - Tamanho total
L.M - Largura Máxima
EA-V - Distância da extremidade anterior-vulva
V-A - Distância vulva-ânus
V-EP - Distância vulva-extremidade posterior
C.E - Comprimento Esôfago
LME - Largura Máxima Esôfago
PCB - Profundidade Cápsula Bucal
LMCB - Largura Máxima Cápsula Bucal
ESP. - Espículo
R.V - Relação vulvar

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975.

O calicéfalo que dá motivo à presente publicação identifica-se por sua morfologia, na chave presente neste trabalho, a *K. subulatus*, isto é, apresenta os caracteres anatômicos definidos por Schad.

Schad coloca na sinonímia de *K. subulatus*: *K. boae* (Blanchard, 1886) e *K. chitwoodi* Caballero, 1954. Tidas como perfeitas as afirmações de Schad, amplia-se consideravelmente a área de dispersão de *K. subulatus*, que passa a incluir Antilhas e América Central e possivelmente o México.

Discutindo *K. inermis coronellae*, Schad declara que *K. agkistrodontis* Harwood, 1932; *K. humilus* Caballero, 1958; *K. implicatus* Kreis, 1938 e *K. conoideus* Comroe, 1948, são sinônimos daquela subespécie.

É sibilina a argumentação de Schad, quando confronta *K. inermis* e suas subespécies; foi por isso que transcrevemos quase integralmente sua opinião. Aliás, à páginas 1047 e 1048 de sua monografia, diz ele: "Similarmente, *K. inermis* é difícil de definir morfologicamente, de modo a se excluir *K. subulatus*. Todavia *K. subulatus* não é difícil de se distinguir de *K. inermis* na prática, desde que apenas é necessário ser distinguido de *K.i. inermis* e de *K.i. macrovulvus*, que são os representativos de *K. inermis* ocorrendo dentro da área de *K. subulatus*. Onde coincidem, as espécies apresentam diferenças muito pronunciadas na forma da cauda da fêmea e na composição da raia dorsal. *K.i. coronellae*, que ocorre ao norte dequelas, mostra maior semelhança com *K. subulatus* na forma da cauda e tem uma composição idêntica da raia dorsal".

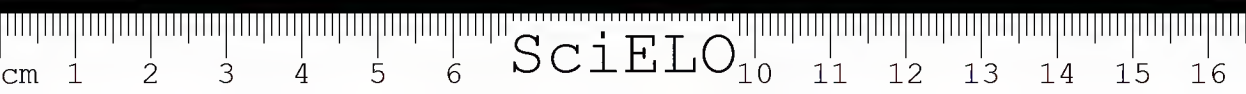
Levando na devida conta as informações a nosso dispor, merecem ser ressaltadas as seguintes ponderações:

a) Não encontramos *K. subulatus* em serpentes (incluindo boideos) na região centro-sul do Brasil. Aparentemente, a área de dispersão de *K. subulatus* se estende desde a Amazônia até a América Central e Antilhas. Em parte, pelo menos, se superpõe à área de dispensão de *K. inermis coronellae*.

b) Segundo Schad, até o presente, *K. subulatus* foi considerado parasito exclusivo de *Boa constrictor* (acrescentamos, e suas subespécies). Nesta publicação assinalam-se novos hospedeiros, *Epicrates cenchria cenchria* e *Corallus caninus*. Provavelmente, uma investigação mais profunda aumentará o número de hospedeiros do nematóide em apreço.

c) *K. inermis coronellae* morfologicamente se confunde com *K. subulatus;* quando se superpõem as áreas de dispersão dessas duas espécies não existe outro elemento classificatório que o dos hospedeiros (*K.i. coronellae* ainda não foi referido em ofídios da família *Boidae*).

d) É de se prever que um estudo adequado concluirá pela sinonímia de *K.i. coronellae*, como sendo realmente *K. subulatus;* contribui para esta hipótese, repetimos, a frouxa especificidade parasitária dos calicéfalos.

e) Confirmada a hipótese *d*, deixará de existir a especificidade de K. *subulatus*, como parasito de boideos; aliás a regra entre os calicéfalos, é a frouxa especificidade quanto aos hospedeiros.

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975.

Agradecimentos: Entendemos justo deixar nossos agradecimentos à Diretoria, aos pesquisadores e auxiliares do Instituto Butantan, pelo franco apoio, fornecendo-nos material e cooperando por todas as maneiras; à srt.ª Wilma Garcia de Souza, pelos serviços de datilografia; aos srs. Cassiano Pereira Nunes, desenhista do Departamento, pela execução dos desenhos; José Navas, técnico, colaborador nas necrópsias e coleta de material e Wagner de Mello, auxiliar técnico, participante das várias atividades no decurso da pesquisa.

ABSTRACT: *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861, is redescribed and confirmed as a valid species.

We have found *K. subulatus* in *Boa constrictor constrictor, Epicrates cenchria cenchria* and *Corallus caninus;* all those snakes had been brought from the Amazonic region.

According to the view point exposed in this paper, since *K. inermis coronellae* and *K. subulatus* are morphologically alike and their expanding areas are common in part, it is possible that *K. i. coronellae* and *K. subulatus* may be synonymous. If this hypothesis is true, the parasitism of *K. subulatus*, a South and Central America species reaching Mexico, is not limited to *Boidae* snakes. Considering the information at our disposal, the following conclusions may be related: a) *K. subulatus* has not been found in snakes of South-Brasil, including *Boidae* species. It seems that the dispersion of *K. subulatus* reaches from Amazonia to Central America and the Caribbean Islands. At least, part of this dispersion is common to that of *K. i. coronellae.* b) According to Schad, the only host of *K. subulatus* is *Boa constrictor* (its subspecies, must be added). In this paper new hosts are reported: *Epicrates cenchria cenchria* and *Corallus caninus*. Further investigation will probably show that a larger number of snakes can harbor *K. subulatus*, as it is known how feeble is the parasitic specificity of *Kalicephalus* species. c) *K. inermis coronellae* is morphologically similar to *K. subulatus:* since their dispersive areas overlap, there is no other classifying element besides the host range. *K.i.coronellae* has not yet been found in snakes of the *Boidae* family. d) Future research may well show that *K.i.coronellae* is really a synonym of *K. subulatus*.. e) If hypothesis *d* can be confirmed, the specificity of *K.subulatus* for *Boidae* must be set aside; this conclusion will fit the general rule that *Kalicephalus* are helminths with feeble host-specificity.

UNITERMS: *Kalicephalus subulatus. Nematoda, Diaphanocephalidae.* Morphology. Incidence. Snakes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BLANCHARD, R. Notices helminthologiques (première sériè). *Bull. Soc. Zool., 11:* 294-304, 1886.

2. CABALLERO Y.C., E. Nematodes parasites des reptiles du Mexique. *Ann. Parasitol., 16:* 327-333, 1938.

FERNANDES, M.P.M. & ARTIGAS, P.T. *Kalicephalus subulatus* Molin, 1861 (*Nematoda, Diaphanocephalidae*). Confirmação desta espécie; informações sobre sua dispersão geográfica e enumeração de serpentes parasitadas.
Mem. Inst. Butantan, 39: 103-121, 1975.

---

3. CABALLERO Y.C., E. Nematodes de los reptiles de Mexique III. *Ann. Inst. Biol. Univers. Nac. México, 10*: 73-82, 1939.

4. CABALLERO, Y.C., E. Estudios helmintologicos de la region de México y de la República da Guatemala. Nematoda, 8.ª parte. *Ann. Inst. Biol. Univ. Nac. México, 25:* 259-274, 1954.

5. CABALLERO, Y.C., E. & VOLGELSANG, G. Fauna helmintológica Venezuelana. III. Alguns nematodas de animales silvestres. *Alv. Med. Vet. y Parasit. Caracas, 9:* 55-57, 1950.

6. CAMPANA-ROUGET, A. & CHABAUD, G. Note sur quelques nematodes africains. Collection Camile Desportes. *Ann. Parasitol., 25:* 308-324, 1950.

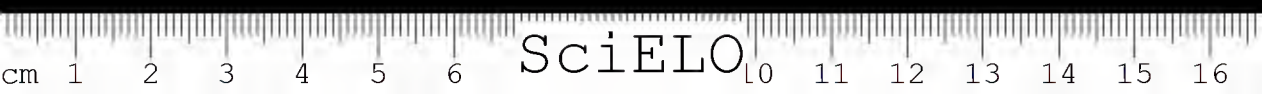
7. HSU, H.F. On some *Kalicephalus* species from China with a description of certain characters of the genus. *Peking Nat. Hist. Bull, 8:* 375-389, 1934.

8. SCHAD, G.A. Studies on the Genus *Kalicephalus (Nematoda, Diaphanocephalidae)*. II. A taxonomic revision of Genus *Kalicephalus* Molin, 1861. *Can. J. Zool., 49:* 1035-1165, 1962.

9. STIMSON, A.F. Liste der rezenten *Amphibien* und *Reptilien. Boidae (Boidae + Boyeriinae + Loxoceminae + Pythoninae). in:* Das Tierreich. Berlin, 1969, Lief., *89,* Seite 1-XI, 1-49.

10. YAMAGUTI, S. Systema helminthum. London, Interscience Publishers, 1961.

Recebido para publicação em 30-VI-1975 e aceito em 27-X-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 123-133. 1975

G- AND C-BANDS IN HUMAN CHROMOSOMES TREATED WITH SNAKE VENOMS. *

ITAMAR ROMANO GARCIA RUIZ and WILLY BEÇAK
Serviço de Genética, Instituto Butantan

ABSTRACT: The *in situ* effect of the *Bothrops jararaca* venom and that of other snake species on human chromosomes has been studied. G-bands and in some instances C-bands similar to those obtained with trypsin have been observed. Tests carried out with the proteolytic fraction of the *Bothrops jararaca* venom as well as the effect of pH and temperature variation demonstrated that banding is due to venom proteases. The *Crotalus durissus terrificus* venom considered of low proteolytic activity evidenced bands in preparations treated for 30 min, while highly proteolytic venoms as those of *Bothrops jararaca* and *Lachesis muta* provoked the same effect within only 1-2 min. Weak G-banding was observed in preparations treated with *Micrurus frontalis* venom after 5 min of exposition. The proteases of the venoms studied show trypsin-like properties but their activity is lower than that of trypsin.

UNITERM: Chromosome banding by snake venoms.

INTRODUCTION

The different G-banding techniques reveal a similar pattern for each pair of homologue chromosomes in all organisms referred up to present. Constancy as to the number of bands and their position in each chromosome indicates a stable and characteristic distribution of its components. In the case of human chromosomes it was possible to determine the type of DNA present in the G-bands and in some of the C-bands. The G-bands are AT-rich DNA while the interbands are GC-rich (Comings [5], 1973). As to the C-bands the pericentromeric region of the chromosomes 1 and 16 are AT-rich satellite II DNA (Corneo et al. [6], 1970); the pericentromeric region of chromosome 9, the centromeres and

* Research supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Brazilian National Reseach Council and Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan. This work was approved as part of a Thesis for Master of Sciences submitted to the Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.
Adress: Serviço de Genética — Instituto Butantan — Caixa Postal 65 — S. Paulo — Brasil.

satellite of the D and G chromosome groups contain satellite III DNA (Jones et al.[10], 1973), AT-and GC-rich (De La Chapelle et al.[3], 1973) and finally the distal region of the Y chromosome is highly repetitive AT-rich DNA (De La Chapelle et al.[3], 1973).

Although a number of substances and procedures were quoted in the literature to evidence those chemically differentiated regions, no reference was found as to a possible snake venom effect. The particular composing substances of a venom are still not well known. Yet several of them show proteolytic activity which would be interesting to test on the chromosomes. The aim of this work was to investigate whether the venoms would produce any different alteration in human chromosomes, and whether there was an specific action for a type venom and/or for a determined region of one or more chromosomes.

MATERIAL AND METHODS

Metaphase chromosomes were obtained by short-term cultures from peripheral blood leucocytes incubated for 72 h at 37°C (Beçak[2], 1961) Colcemid (Ciba) $1x10^{-6}$M, 0.05 ml, was added 2 h prior to harvesting the culture. After hypotonic treatment with 0.075M KCl, the material was fixed with 3:1 methanol-acetic acid. Air-dried 2 or 3 day old cytological preparations were treated with solutions of a crystallized snake venom pool and dissolved in M/15 Sorensen buffer pH 7.0, in concentrations varying between 0.025-0.1% at 37°C. The preparations were then washed in buffer and immediately stained in 2-3% Giemsa (Merck) diluted in phosphate buffer pH 6.8 for 5-10 min.

Control preparations were treated with Sorensen buffer pH 5.0-9.0 and others with trypsin (Maknur, 1:250) in Sorensen in the same concentration and pH used for the venoms.

The following tests were carried out in order to identily the active component in the *Bothrops jararaca* venom:

1. Addition of inhibitors

   a) EDTA-2Na

Solution 0.1% of *Bothrops jararaca* venom, pH 7.0 plus 10% EDTA-2Na was incubated at 37°C for 6 h prior to the tests. Another solution using trypsin instead of *Bothrops jararaca* venom was used as EDTA control over the venom proteases. In order to determine any effect of the EDTA on the chromosomes an EDTA solution was also tested.

   b) $HgCl_2$

Solution 0.1% of *Bothrops jararaca* venom, pH 7.0 with 0.2% $HgCl_2$ was incubated for 1 h at 37°C prior to the tests. Trypsin solution in the same conditions served as control. Another control was prepared with $HgCl_2$ diluted only in phosphate buffer.

2. Proteolytic fraction
Preparations were treated with 0.1% proteolytic fraction solution of *Bothrops jararaca* venom, pH 7.0, 37°C for 2 min.

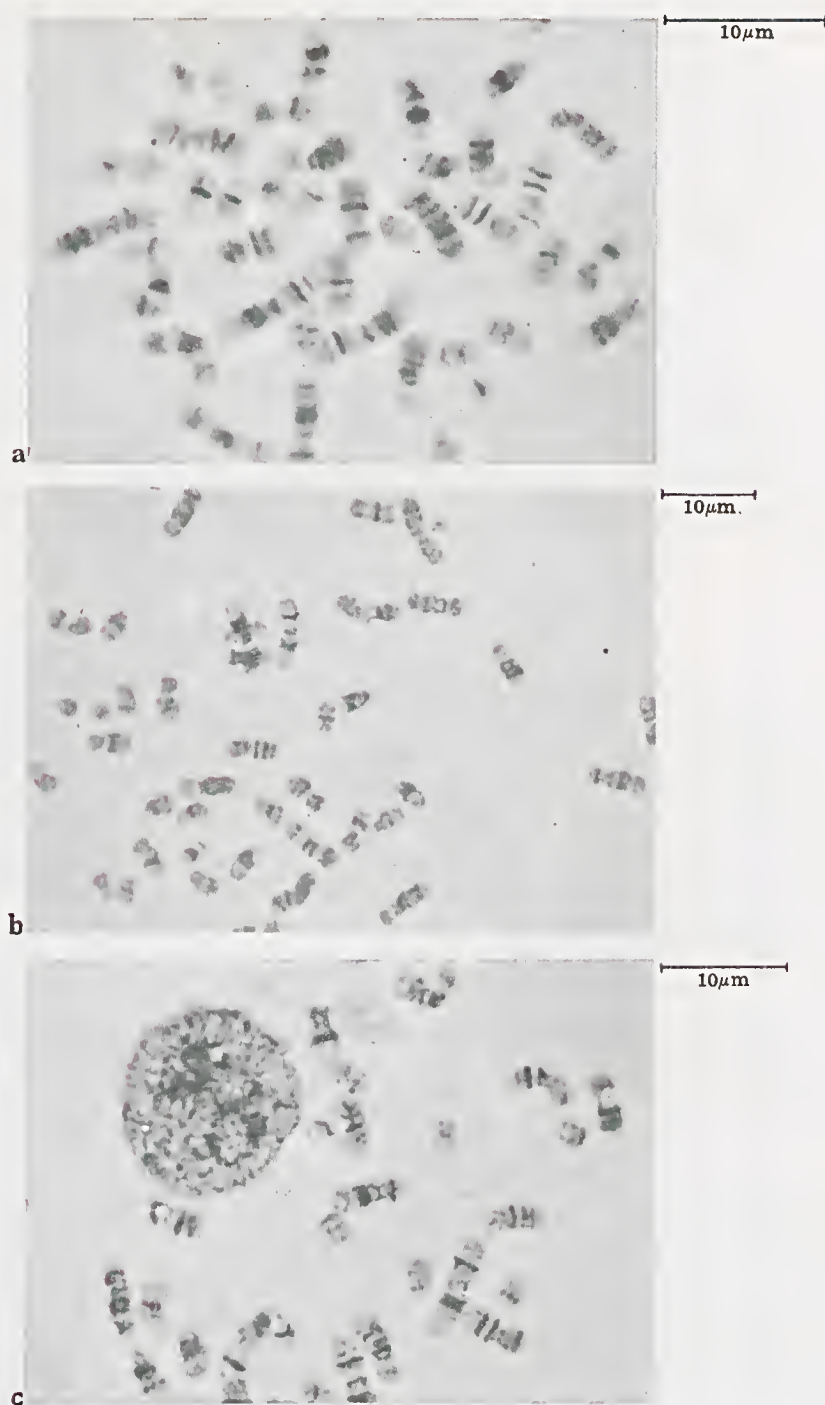



Fig. 1 - G-bands produced by highly proteolytic venoms at 37ºC: (a) 0.1% *B. jararaca* venom pH 8.5 for 5 min; (b) 0.1% proteolytic fraction of *B. jararaca* venom pH 7.0 for 2 min; (c) 0.1% *Lachesis muta* venom pH 7.0 for 2 min.

3. Temperature variation

Bothrops jararaca venom solutions 0.1%, pH 7.0, were kept for 1 h at the following temperatures: 50, 75 and 95°C, and after that for 1 h at 37°C before the tests were carried out.

4. pH variation

The *Bothrops jararaca* venom was dissolved to 0.1% in phosphate buffer, pH 5.0, 8.0, 9.0, adjusted with HCl or NaOH.

5. Other venoms

Besides the tests with *Bothrops jararaca* venom, other ones were done with the venoms of *Lachesis muta, Crotalus durissus terrificus* and *Micrurus frontalis*. The solutions were prepared as mentioned for *B. jararaca* venom tests and the treatment time was different for each species venom.

Several hundreds of metaphases were analysed for each treatment in a blind test.

RESULTS

Chromosome preparations treated with the four species venoms showed G-banding according to the standards established in the Paris Conference "Standardization in Human Cytogenetics" [12] (1971). However variations were observed as to the requirements to obtain such results. Solutions of the whole and of the proteolytic fraction of *Bothrops jararaca* venom, as well as the *Lachesis muta* venom were able to produce banding in almost all metaphases in only 1-2 min (Fig. 1). Venom solution of *Crotalus durissus terrificus* produced banding in about 30% of the exposed metaphases after 30 min (Fig. 2a). Venom solutions of *Micrurus frontalis* produced a weak G-banding in most metaphases after 5 min (Fig. 2b).

On the other hand, the phosphate buffer control pH 6.8 produced a weak G-banding in about 10% of the metaphases after 30 min (Fig. 2c). As to trypsin, G-banding was produced after only 10-12 sec in most of the metaphases; when those preparations were treated for a longer time they were destroyed.

Some old preparations treated with *Bothrops jararaca* venom evidenced C-bands in all chromosomes similar to those obtained with trypsin (Fig. 3a, b). These bands were not identical but wider than those obtained by the Arrighi & Hsu [1] (1971) technique. The pericentromeric regions of the chromosomes 1, 9 and 16 were not specially differentiated as referred by Merrick et al. [11] (1973). Other alterations observed in fresh preparations using a venom solution, mainly of *Bothrops jararaca* and *Lachesis muta* were similar to those produced by an excessive treatment with trypsin solution. Therefore prolonged treatments or the use of very concentrated venom solutions produced "ghost" chromosomes with a barely visible delineation, circular in some cases (Fig. 3c).

Solutions of *Bothrops jararaca* venom, pH 5.0 do not alter the chromosomes. The best G-banding effect was obtained at pH 8.0-9.0.

RUIZ, I.R.G. & BEÇAK, W. G- and C-Bands in human chromosomes treated with snake venoms.
Mem. Inst. Butantan, 39: 123-133, 1975.

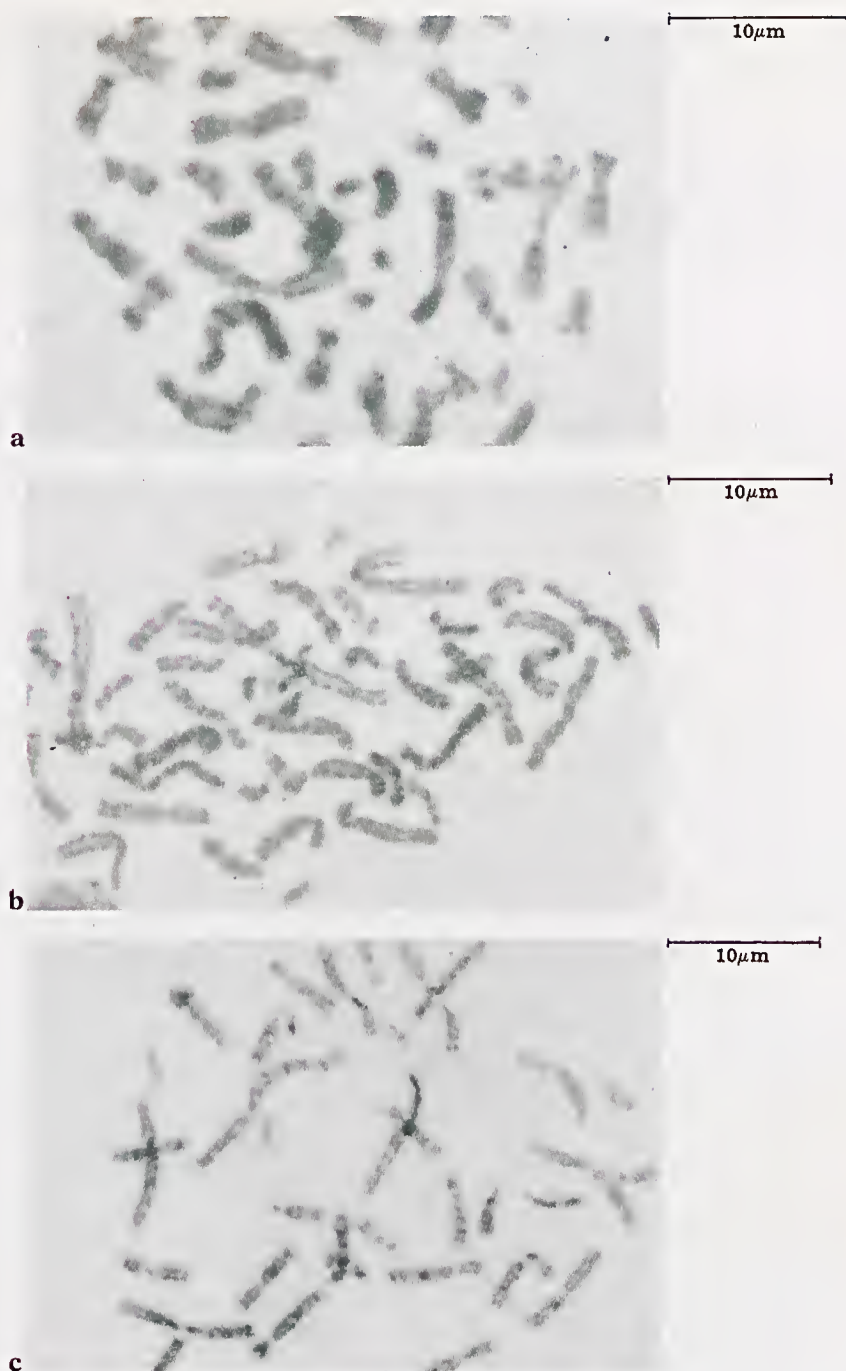



Fig. 2 - Weak G-bands produced by low proteolytic venoms and buffer at 37ºC: (a) 0.1% *Crotalus durissus terrificus* venom pH 6.8. The bands were similar to the ones with buffer but the *C.d. terrificus* venom frequencies of banding were higher; (b) 0.1% *Micrurus frontalis* venom pH 7.0. It was necessary 30 min the *C.d. terrificus* venom to produce the same effect as *M. frontalis* in 2 min; (c) M/15 Sörensen buffer pH 9.0 for 30 min.

When previously kept at 50°C the *Bothrops jararaca* venom does not lose its banding capacity; however, when heated to 75°C and 95°C this property is completely lost.

In the presence of EDTA-2Na, the venom solutions of *B. jararaca* or trypsin undergo some reduction in their activity (Fig. 4). On the other hand solutions of *Bothrops jararaca* venom, or of trypsin containing $HgCl_2$, do not produce any alteration in the chromosomes. The EDTA and $HgCl_2$ control solutions diluted only in phosphate buffer did not evidence any banding.

DISCUSSION

The proteolytic effects obtained with the *Lachesis muta* venom and with the *Bothrops jararaca* venom, (which contains at least 3 proteases according to Henriques et al.[8], 1966) are known to be more intense than with the *Crotalus durissus terrificus* and *Micrurus frontalis* venoms (Rosenfeld[13], 1959). Those so called proteolytic venoms (from *Bothrops jararaca* and *Lachesis muta*) were much more efficient in G-banding production.

The best banding results were obtained with solutions at pH 8.0-9.0, the optimal pH of proteases.

It was reported that at 75°C and 95°C venom proteases become inactivated (Sarkar & Devi[14], 1968). Venom solutions previously heated at these temperatures actually do not produce any banding. EDTA inhibits some of the snake venom components, mainly proteases (Henriques et al.[7], 1960). Under our conditions, EDTA-2Na reduced the banding capacity of *Bothrops jararaca* venom solutions, reducing also the activity of trypsin used as control. These substances were totally inhibited in the presence of $HgCl_2$, known as a proteolytic inhibitor (Taborda[16], 1940). The effects obtained with the proteolytic fraction and with the whole venom of *Bothrops jararaca* are identical to those obtained by trypsin and other proteases (Seabright[15], 1972).

It can be inferred that the chromosome alterations are due to the venom proteolytic fraction. Apparently all other venom components (Jiménez-Porras[9], 1970) had no influence on these alterations. The resistance of the centromeric region to the proteolytic action is possibly due to its special composition (repetitive DNA) and packing.

Some authors (Chiarelli[4], 1973) suggest that the proteases exert a denaturing effect on the proteins of the DNA-protein complex. At the optical level, the alterations described in this paper are seen as a gradual deformation of the chromosomes starting with an uncoiling of the chromatids. Apparently this is followed by an apposition of certain corresponding regions in both chromatids, and the formation of bands, that by a more intense effect become destroyed. Under these conditions the centromeric material may be more resistant to the treatment, showing the aspect of bands. Only the contour of the chromatids, which may join, is then observed; a less visible inner contour is also noted (Fig. 3c). There are instances where the p and q arms seem to become continuous, the centromeric material disappears and the chromosome shows a circular aspect.

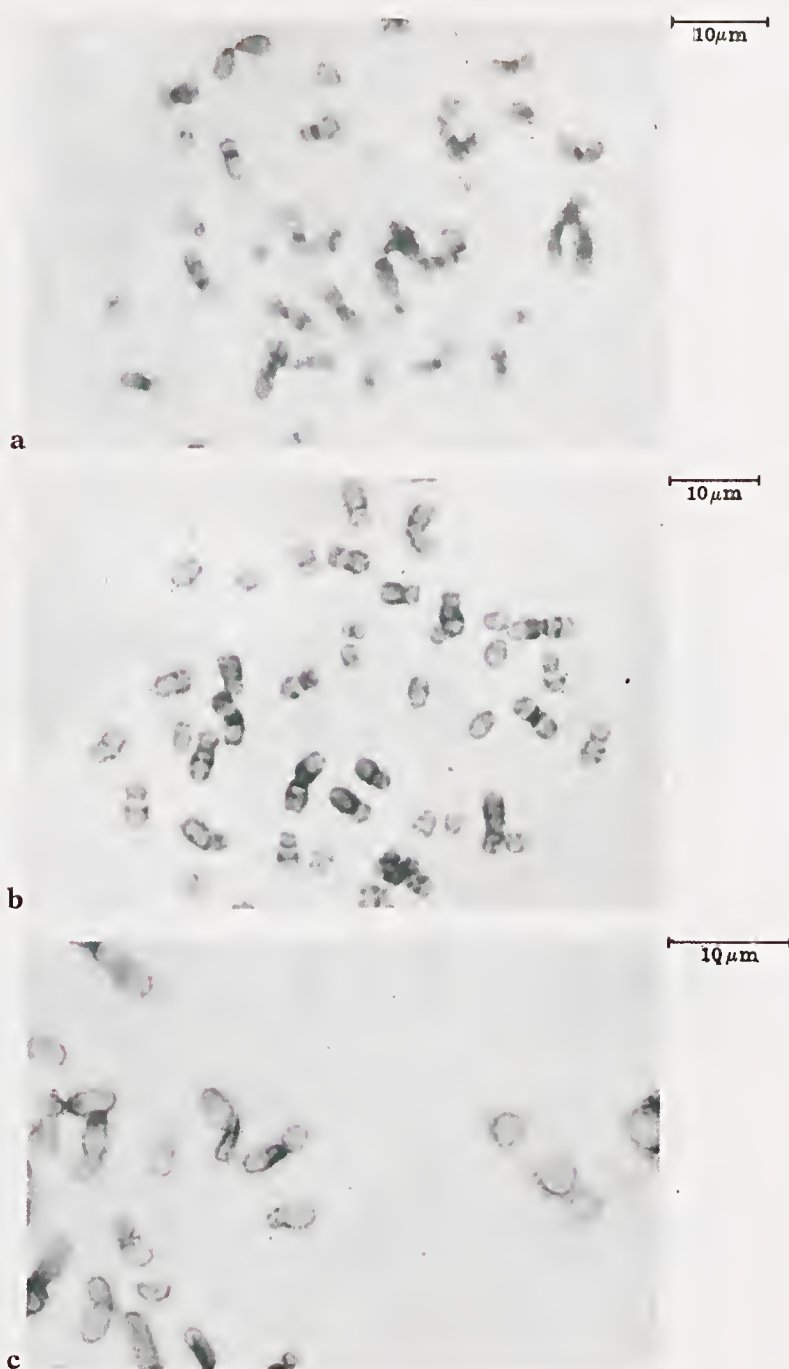



Fig. 3 - Chromosomes showing remnants of bands: (a) C-bands produced by 0.05% *B. jararaca* venom pH 7.0 at 37°C for 10 min on 4 month old chromosome preparation. Similar but not identical to the ARRIGHI & HSU patterns; (b) C- and G-bands produced by 0.1% trypsin diluted in Sörensen buffer pH 6.8 at room temperature for 15 sec; (c) C-bands or circular aspect produced by 0.1% *B. jararaca* venom pH 9.0 at 37°C for 6 min.

RUIZ, I.R.G. & BEÇAK, W. G- and C-Bands in human chromosomes treated with snake venoms.
Mem. Inst. Butantan, 39: 123-133, 1975.

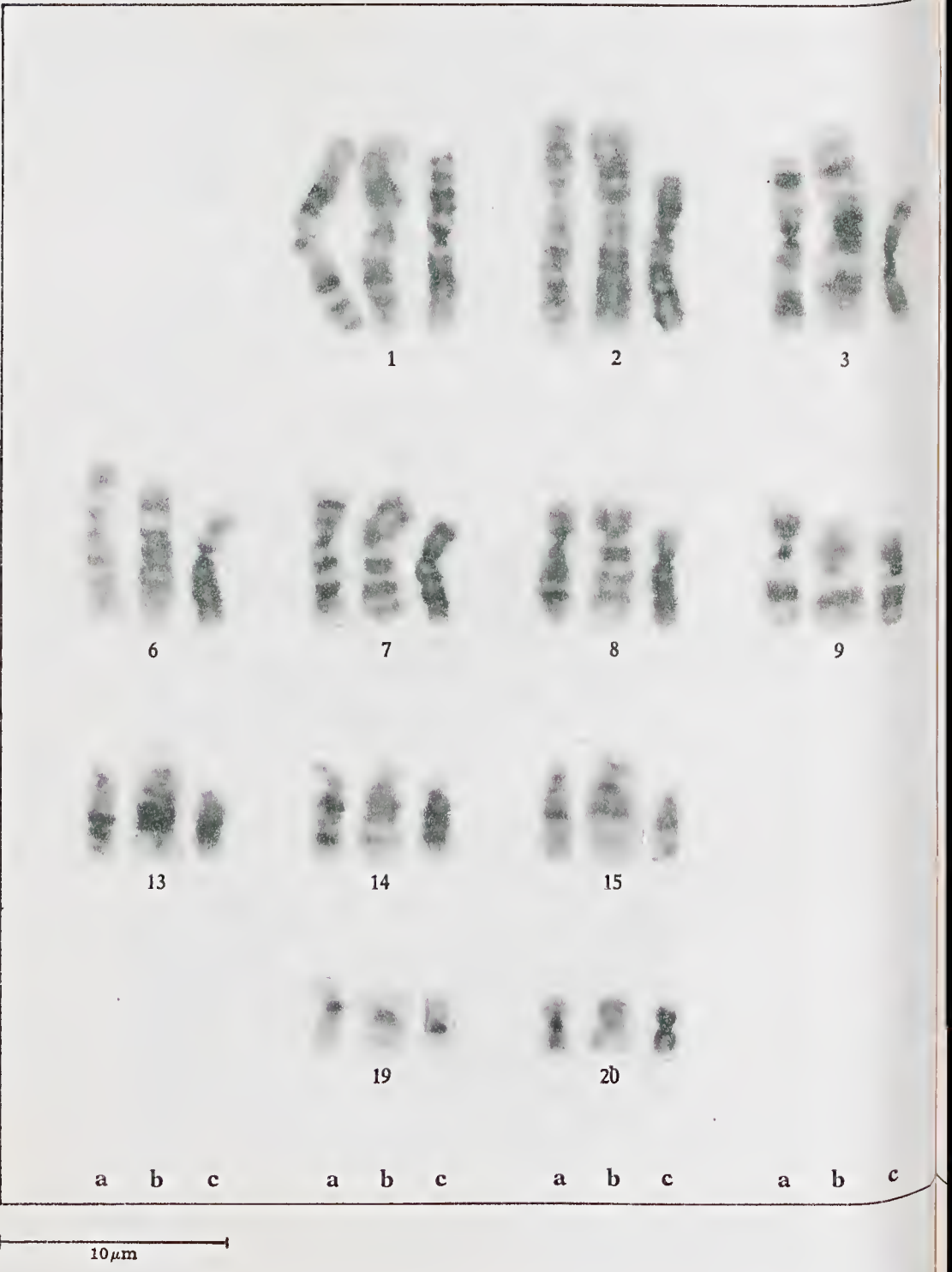
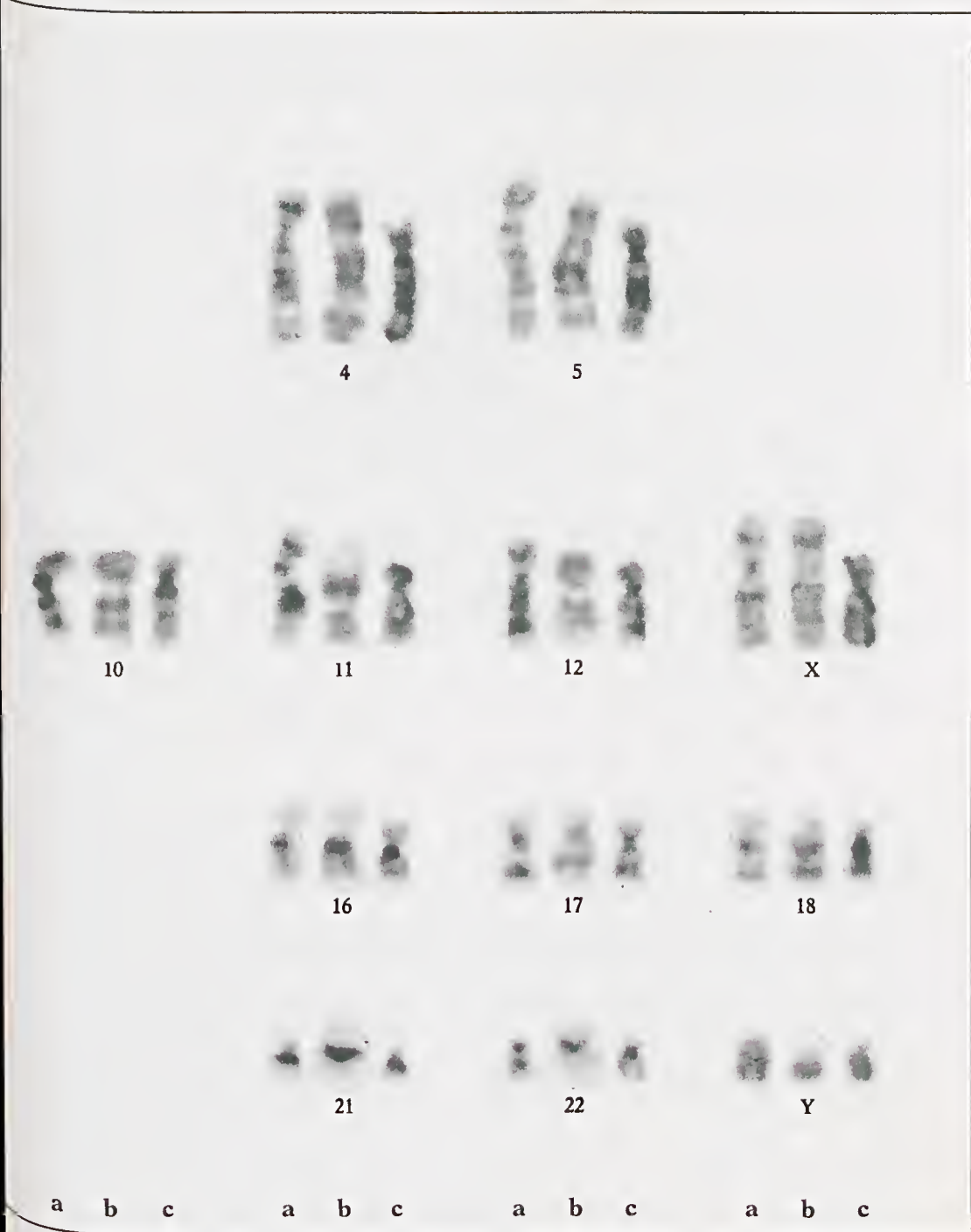



Fig. 4 - Idiogram showing similar G-bands produced by trypsin (a), *B. jararaca* venom (b) and *B. jararaca* venom plus 10% EDTA-2Na (c). The venom-EDTA mixture was incubated at 37°C for 4 hours, resulting in a slight venom inhibition.

RUIZ, I.R.G. & BEÇAK, W. G- and C-Bands in human chromosomes treated with snake venoms.
Mem. Inst. Butantan, 39: 123-133, 1975.

CONCLUSION

The observed banding phenomenon is due to the proteolytic fraction of the venoms studied. The effect varied according to their degree of proteolytic activity and the experimental conditions.

Acknowledgments: We thank Mrs. Sibylle Heller for the editorial aid and Javier Coll, M. Sc., for his suggestions.

RESUMO: Foi estudado o efeito *in situ* do veneno de *Bothrops jararaca* e outras espécies de ofídios sobre cromossomos humanos. Observaram-se bandas G, e em alguns casos bandas C, semelhantes às observadas com tripsina. Testes efetuados com fração proteolítica do veneno de *Bothrops jararaca* bem como o efeito da variação de pH e temperatura demonstraram que esse bandeamento é devido às proteases dos venenos. O veneno de *Crotalus durissus terrificus*, considerado de baixa atividade proteolítica evidenciou bandas em preparações tratadas por 30 min, enquanto venenos altamente proteolíticos como os de *Bothrops jararaca* e *Lachesis muta* produzem o mesmo efeito em apenas 1-2 min. Bandeamento G fraco foi observado em preparações tratadas com veneno de *Micrucus frontalis* após 5 min de exposição. As proteases dos venenos estudados mostram propriedades semelhantes às da tripsina, porém, sua atividade é menor que a daquela.

UNITERMO: Bandeamento cromossômico com venenos ofídicos.

REFERENCES

1. ARRIGHI, F.E. & HSU, T.C. Localization of heterochromatin in human chromosomes. *Cytogenetics, 10:* 81-86, 1971.

2. BEÇAK, W. Human chromosomes in short-term cultures from peripheric blood leucocytes. *Rev. brasil. Biol., 21:* 281-286, 1961.

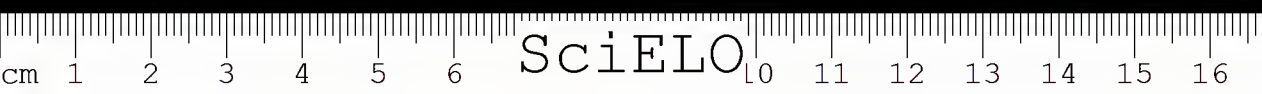
3. CHAPELLE, A. DE LA; SCHRÖDER, J.; SELANDER, R. K. & STENSTRAND, K. Differences in DNA composition along Mammalian metaphase chromosomes. *Chromosoma* (Berl.), *42:* 365-382, 1973.

4. CHIARELLI, B. Hypothetical mechanism of action involved in producing bands with trypsin and other substances on chromosomes. *Mamm. Chrom. Newsletter, 14:* 19-21, 1973.

5. COMINGS, D.E. Biochemical mechanisms of chromosomal banding and color banding with acridine orange. *in: Nobel 23 Chromosome Identification,* : 293-299, 1973.

6. CORNEO, G.; GINELLI, E. & POLLI, E. Repeated sequences in human DNA. *J. Mol. Biol., 48:* 319-327, 1970.

7. HENRIQUES, O.B.; FICHMAN, M. & HENRIQUES, S.B. Partial purification and some properties of the blood-clotting factor from the venom of *Bothrops jararaca. Biochem. J., 75:* 551, 1960.

8. HENRIQUES, O.B.; MANDELBAUM, F.R. & HENRIQUES, S.B. Proteolytic enzymes of Bothrops venom. *Mem. Inst. Butantan, 33:* 359-370, 1966.

---

9. JIMÉNEZ-PORRAS, J.M. Biochemistry of snake venoms (a review). *Clin. Toxicol., 3:* 389-431, 1970.

10. JONES, K.W.; PROSSER, J.; CORNEO, G. & GINELLI, E. The chromosomal location of human satellite DNA III. *Chromosoma* (Berl.), *42:* 445-451, 1973.

11. MERRICK, S.; LEDLEY, R.S. & LUBS, H.A. Production of G and C banding with progressive trypsin treatment. *Pediat. Res., 7:* 39-44, 1973.

12. Paris Conference 1971. Standardization in human cytogenetics. Birth Defects: original article series, VIII, 7. New York, The National Foundation, 1972.

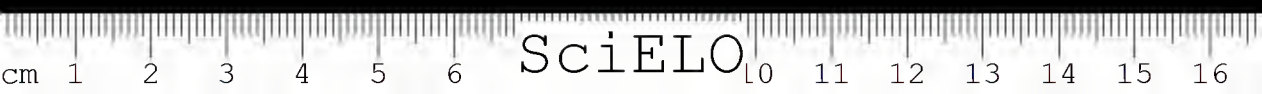
13. ROSENFELD, G.; HAMPE, O.G. & KELEN, E.M.A. Coagulant and fibrinolytic activity of animal venoms; determination of coagulant and fibrinolytic index of different species. *Mem. Inst. Butantan, 29:* 143-163, 1959.

14. SARKAR, N.K. & DEVI, A. Enzymes in snake venoms. *In:* Bücherl, W., Buckley, E.E. and Deulofeu, V. (eds.). Venomous animals and their venoms. New York, 1968. p. 169-216.

15. SEABRIGHT, M. The use of proteolytic enzymes for the mapping of structural rearrangements in the chromosomes of man. *Chromosoma (Berl.), 36:* 204-210, 1972.

16. TABORDA, L.C. A influência da temperatura sobre os princípios: tóxico, coagulante e proteolítico do veneno de *Bothrops jararaca*. *Mem. Inst. Butantan, 14:* 167-180, 1940.

Recebido para publicação em 30-V-1975 e aceito em 9-VI-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 135-148, 1975

OBSERVATIONS ON THE GERM CELL ULTRASTRUCTURE OF MALE DIPLOID AND TETRAPLOID *ODONTOPHRYNUS AMERICANUS* (AMPHIBIA: ANURA). *

SYLVIA MENDES CARNEIRO
Serviço de Genética, Instituto Butantan

ABSTRACT: An ultrastructural study on the male germinal cells from diploid and tetraploid specimens of *Odontophrynus americanus* (Amphibia — Anura, Ceratophrydidae) was performed from spermatogonia I to early spermatids. The ultrastructural aspects of cells and organelles are similar in the 2n and 4n specimens. The pairing of the four homologues in tetraploids does not occur simultaneously, since only normal synaptonemal complexes were observed.

UNITERMS: spermatogenesis, spermatocytes, synaptonemal complex.

INTRODUCTION

Spermatogenesis in Anura has been studied mainly by light microscopy (King [14], 1907; Saez et al. [25], 1936; Burgos and Mancini [5], 1948). Generally, the ultrastructural studies were made on spermiogenesis (Burgos and Fawcett [4], 1956; Burgos and Vitale-Calpe [6], 1967; Sandoz [26], 1970; Zirkin [29], 1971). The germ cell development in the *Xenopus laevis* male was recently described (Reed and Stanley [23], 1972; Kalt [11], 1973).

This paper deals with the ultrastructural aspects of the spermatogenesis of *Odontophrynus americanus*, a species presenting natural diploid and tetraploid morphologically identical populations, whose cytogenetic aspects have been described by Beçak, M. L. et al. [1,2,3] (1966, 1967, 1970). The zygotene chromosomes pair in a bouquet-like configuration forming 4 loops in the tetraploids (Beçak, M. L. et al. [2], 1967).

---

* Research supported by the "Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo" and "Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan". This work was approved as part of a Thesis for Master of Sciences submitted to the Instituto de Biociências at the University of São Paulo.
Adress: Caixa Postal 65 — S. Paulo — Brazil

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

The aim of this study was to analyse by the electron microscope the different spermatogenetic phases in the diploid and tetraploid systems, as well as the behavior of the synaptonemal complex in the 4n specimens.

MATERIAL AND METHODS

Testis fragments of diploid and tetraploid specimens from Botucatu and São Roque (S.P.) respectively, were fixed for 2 h at 4°C in 0.26 M of a 2% glutaraldehyde solution, pH 7.2, in Millonig buffer (Millonig [17], 1961). The material was washed in isotonic buffer and postfixed in 1% osmium tetroxide in Millonig buffer for 30 min, then rinsed in 0.85% saline. Staining was made with 1% uranyl acetate according to Kellenberger [12], (1958), and dehydration ingraded ethanol. Pre-inclusion was carried out in Polylite 8001 mixed 1:1 with acetone from 2 to 12 h, and the embedding in the same resin mixed with benzoil peroxide at 0.1 g/ml (Coiro et al. [8], 1972).

Ultrathin sections of about 50-70 nm obtained with a Porter-Blum MT I ultramicrotome were stained with 2% uranyl acetate for 10-20 min followed by lead citrate (Reynolds [24], 1963) for 5-10 min, and examined in a Siemens electron microscope Elmiskop I at 60 KV. Sections of about 2-3 μm were used as controls in the light microscope.

RESULTS

a) General observations in the light microscope

Diploid and tetraploid seminiferous tubules in transversal sections are seen surrounded by conjunctive tissue, rich in interstitial cells (Fig. 1). Sparse capillaries are also found. At the inner tubular wall, cysts surrounded by follicular cells are seen in different development stages. Spermatids in differentiation are observed in the follicular cell cytoplasm.

b) Germ cell ultrastructure

Spermatogonia I (Figs. 2, 3, 15) are surrounded by one or more follicular cells. Their longest axis is of about 20-30 μm. The lobated nucleus shows dispersed chromatin, and one or more large nucleoli with some clear zones. The cytoplasm contains smooth endoplasmic reticulum and sparse ribosomes. In some cells, annulate lamellae with a variable number of components (Fig. 3), and a circular chromatoid body are observed (Fig. 2). Groups of mitochondria are polarized at one or more regions of the cell. Among these organelles, material of great electron density can be seen.

Spermatogonia II (Fig. 4) present a slightly lobated nucleus, and a more condensed chromatin content. The nucleolus is large and compact, frequently showing a linear electron dense component, delimited by a narrow clear zone of polygonal or circular outline (Fig. 16). In the cytoplasm, Golgi complex, sparse and grouped mitochondria, ribosomes, and a chromatoid body were observed.

Spermatocytes I present a circular nucleus. During leptotene, chromatin begins to condense, but axial formations were rarely seen (Fig. 5). The nucleolus is compact as in spermatogonia II, and also may show the linear electron dense

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

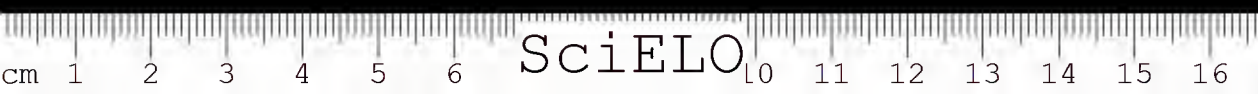
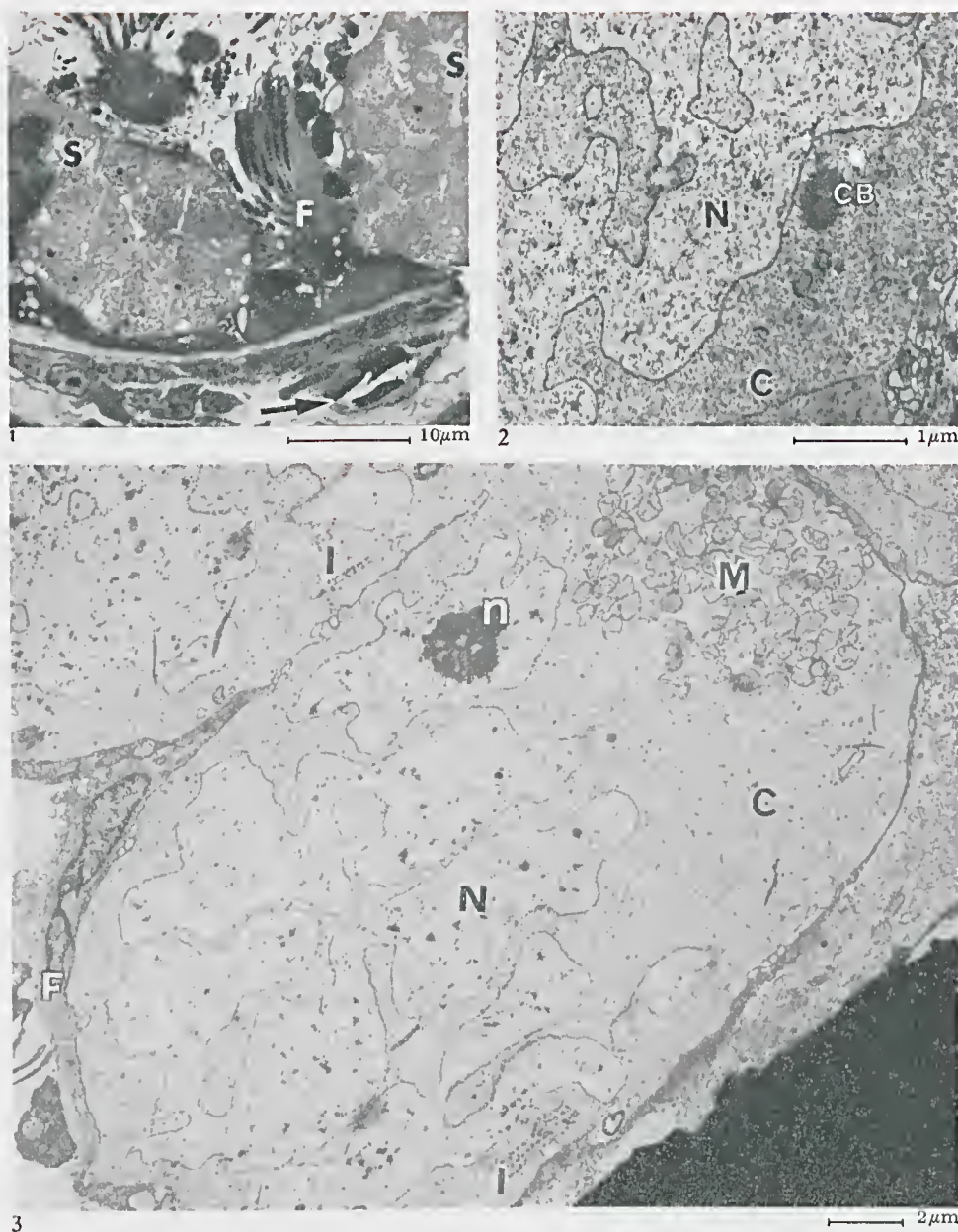



Fig. 1 - Light micrograph of a cross section of the seminiferous tubule (4n). Within the tubule: spermatocysts (S) containing spermatocytes I in zygotene or pachytene; follicular cells associated spermatids (F), Conjunctive tissue with Leydig cells and one capillary (arrow) surrounding the tubule.

Fig. 2 - Chromatoid body (CB) in the cytoplasm of a 2n spermatogonium I.

Fig. 3 - Spermatogonium I (4n). Highly lobulated nucleus (N) with dispersed chromatin, and one nucleolus (n) with some clear zones. In the cytoplasm (C): mitochondria aggregate (M) polarized at the cell bottom with electron dense material between some of them; annulate lamellae (1). Follicular cell (F) cytoplasm enveloping the spermatogonium I.

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

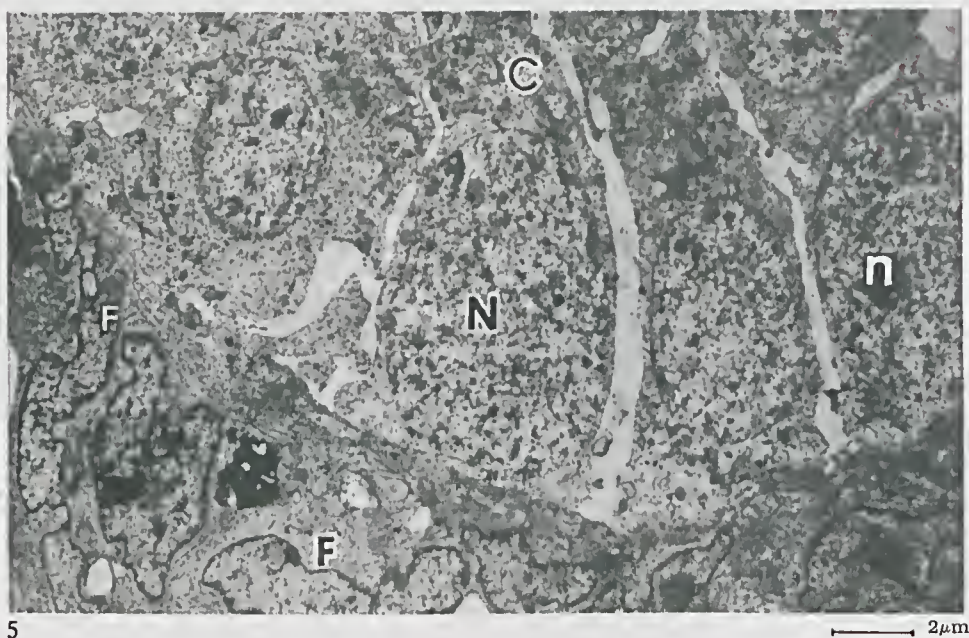
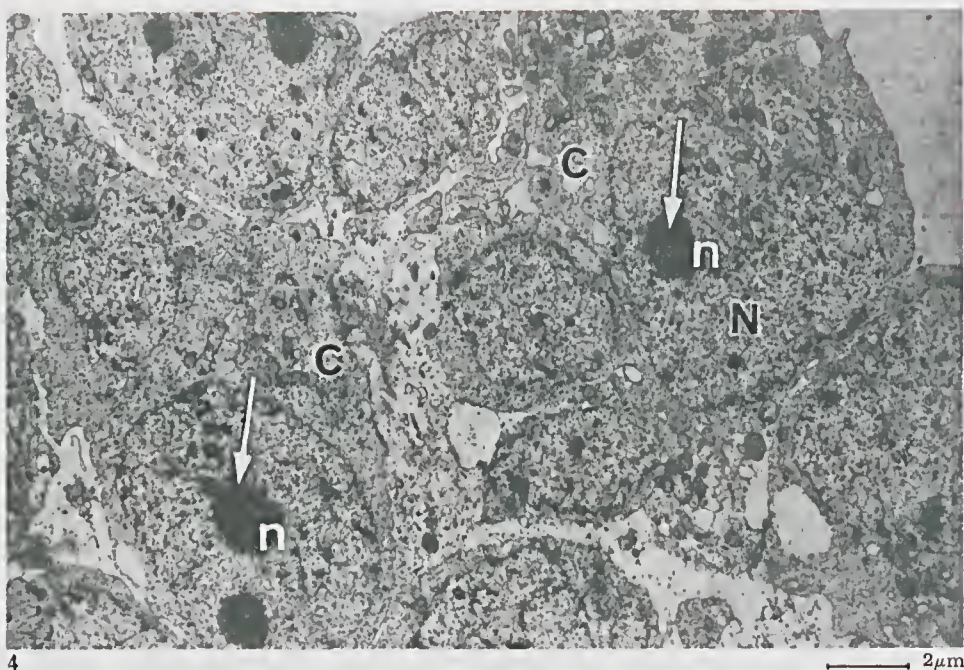



Fig. 4 - Spermatogonia II (4n): the slightly lobulated nucleus (N) presents chromatin more condensed than in the earlier phase. Some compact nucleoli (n) show in this phase an electron dense component with polygonal or lamellar aspect (arrows). Cytoplasm (C) with mitochondria, Golgi complex, polysomes and chromatoid body.

Fig. 5 - Pre-meiotic leptotene spermatocytes (2n) of synchronous development in the cyst surrounded by follicular cells (F). Nucleus (N) nearly circular with a slightly condensed chromatin, and a nucleolus (n). Cytoplasm with Golgi complex, mitochondria and polysomes.

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

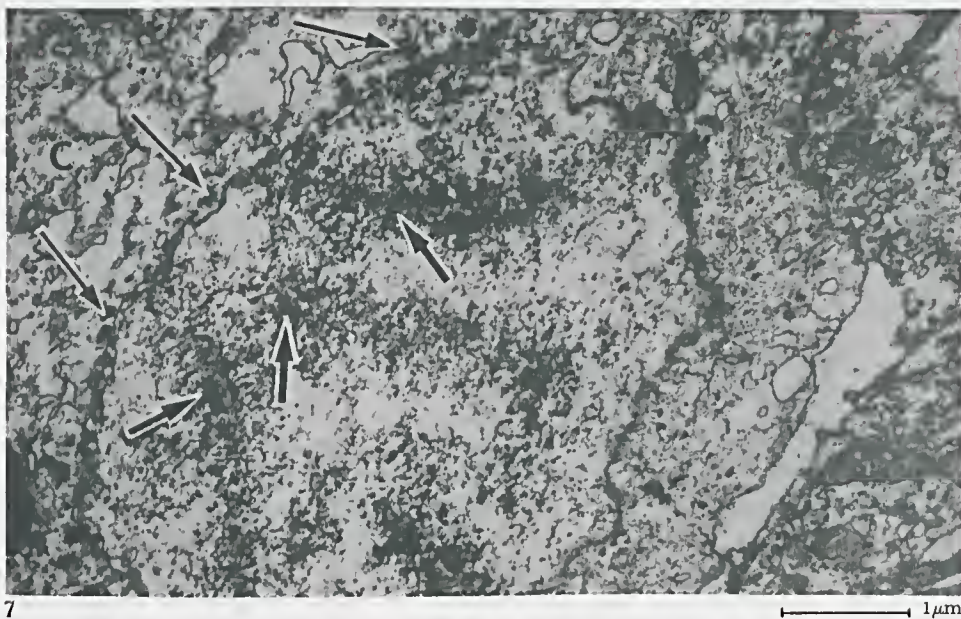
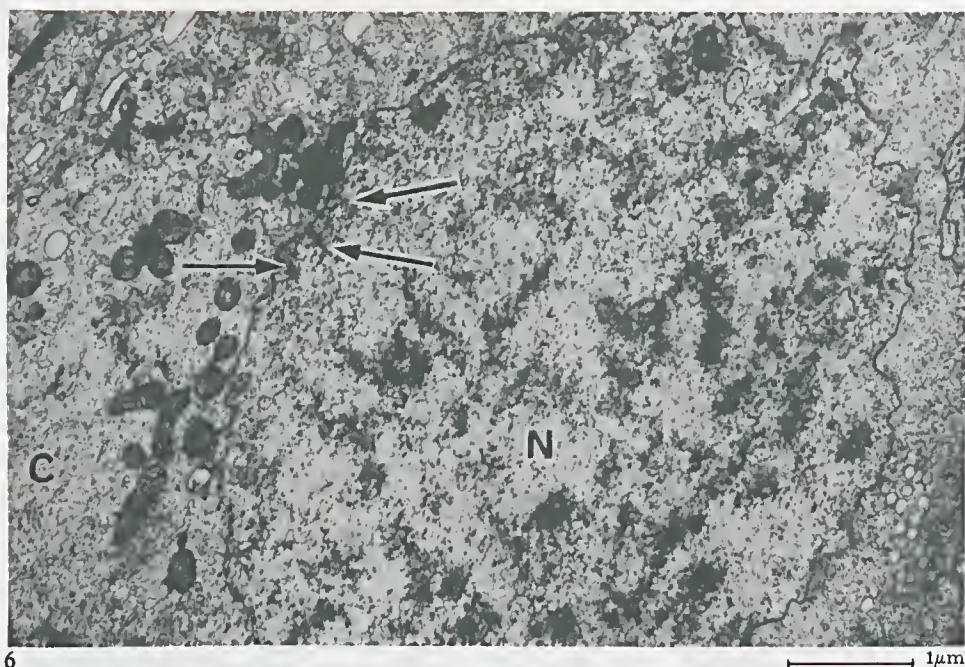



Fig. 6 - Early zygotene stage spermatocyte (4n). The nucleus (N) shows short axial elements (arrows) converging to a plane zone of the nuclear membrane where the homologue pairing probably starts. Cytoplasm presents mitochondria, Golgi complex, polysomes, and smooth endoplasmic reticulum.

Fig. 7 - Pachytene spermatocyte (4n) characterized by the presence of synaptonemal complex (thick arrow). In this section, the synaptonemal complexes converge to the same nuclear membrane region assuming a bouquet-like configuration. In the cytoplasm (C), electron dense perinuclear formations are seen (arrows).

component of lamellar and polygonal aspect (Fig. 12). The cytoplasm is similar to that of the spermatogonia II. Zygotene (Figs. 6, 8) is characterized by the onset of synaptonemal complex formation. Axial elements are polarized at a more plane region of the nuclear membrane. In both animals the synaptonemal complex is formed by two electron dense lateral elements, 25-35 nm, and one central element of approximately 15 nm. The mean distance between two lateral elements, i.e., the width of the central region, is 130-150 nm. The lateral elements at the zone of insertion in the membrane are ramified and form an electron dense plate over the membrane. The nucleolus (Figs. 14, 17) contains a clear zone which increases in the course of zygotene, attaining finally a ring-like configuration; a parallel array of the nucleolonema was also seen in early zygotene (Fig. 13). In pachytene (Figs. 7,9), the synaptonemal complexes are completely developed, and in some sections, bouquet-like configurations can be found (Fig. 7). No double or anomalous synaptonemal complexes were observed in the animals under study. The cytoplasm surrouding the membrane, mainly at the region of synaptonemal complex convergency, presents rounded perinuclear electron dense formations (Figs. 9, 10) with diameters of about 100-200 nm. These elements are observed from leptotene onwards, although in lesser numbers. Cytoplasm is similar to that described for the earlier phase.

In the early spermatids (Figs. 19, 20), chromatin appears in form of fine filaments, regularly distributed in the nucleus. The rarely seen nucleolus (Fig. 20) has a compact aspect, and is placed near the membrane. The cytoplasm presents cysterns of smooth endoplasmic reticulum, flattened peripheric vesicles, ribosomes, and centrioles next to a small depression in the nuclear membrane (Fig. 20). In several sections, a chromatoid body is observed (Fig. 19).

As the spermatid matures, chromatin becomes more electrondense and granular (Fig. 18); a clear region appears between the condensed chromatin grains, where an electron-dense round body, probably a nucleolus, is noted. At this region, a paracrystalline hexagonal formation approximately 8 nm in diameter can be observed in some spermatids (Fig. 18). In transversal sections, this formation is constituted by circular electron-dense units of about 27 nm in diameter, grouped according to a hexagonal pattern at a distance of about 25-27 nm. At the periphery of this structure, there seems to be a continuity between the fine fibrils, radiating from the units, and the fibrils emerging from the condensed chromatin rods. In longitudinal sections, the paracrystalline body is constituted by electron-dense bands, 200 nm in length, and approximately 27 nm in width. The distance between the bands is 18-27 nm.

The cytoplasm of spermatids in an advanced stage shows microtubules next to the nucleus; at the periphery there are polyribosomes, fused mitochondria, cysterns and vesicles of smooth endoplasmic reticulum, and annulate lamellae (Fig. 11) with a variable number of elements close to the vesicles or to the nuclear membrane.

DISCUSSION

Spermatogenesis develops in the seminiferous tubules with out topographic progression. This fact makes identification of the different phases more difficult. Cellular cysts in different stages of spermatogenesis do not follow a special

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

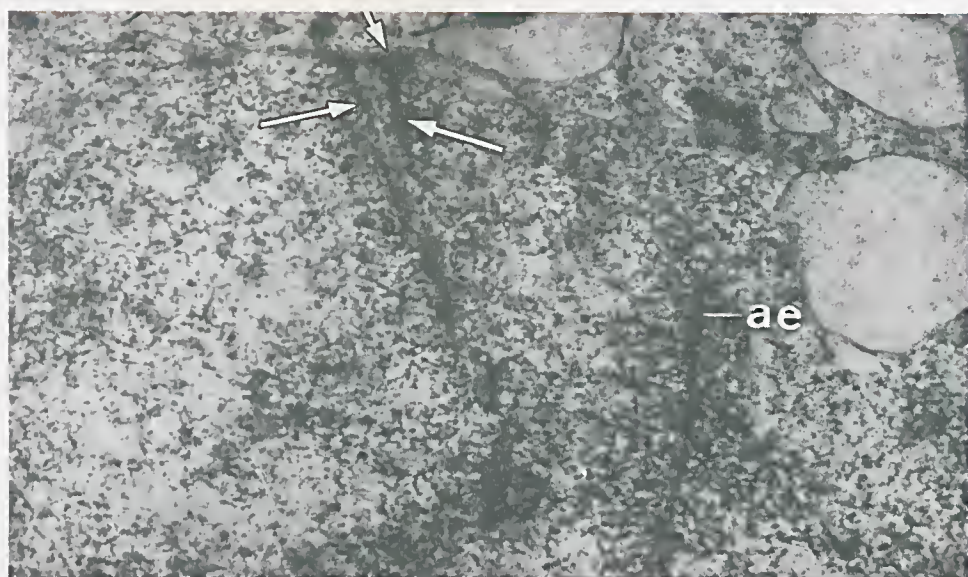
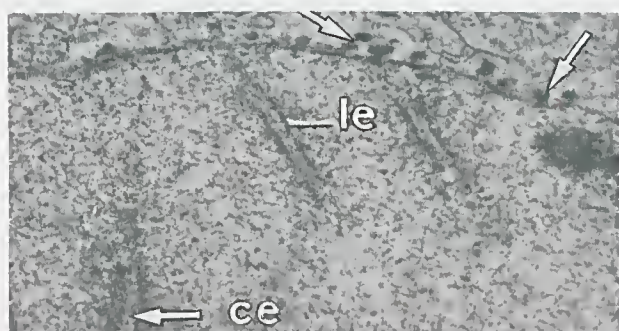
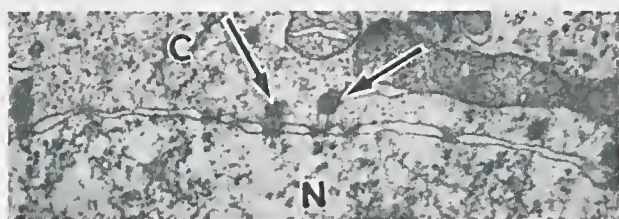



Fig. 8 - Zygotene spermatocyte (2n) shows paired axial (lateral) elements (thin arrows) forming a synaptonemal complex next to a not yet paired axial element (ae). Lateral elements present ramified ends forming a dense plate (thick arrow) over the nuclear membrane.

Fig. 9 - Pachytene nucleus (2n) The synaptonemal complexes are formed by 2 dense lateral elements (le) and a central element (ce). Electron dense formations are seen at the periphery of the nucleus (arrows).

Fig. 10 - Part of the nuclear membrane from an early zygotene spermatocyte (2n). Close to the nuclear membrane pores, electron dense formations are seen in the cytoplasm (arrows).

Fig. 11 - Annulate lamellae (arrows) in the cytoplasm of maturing spermatids.

radial or peripheral order, suggesting that there is no chronological or spatial disposition, except within the cysts originated through division and differentiation of a single spermatogonia I.

The scattered aspect of the chromatin in the spermatogonia, the developed nucleolus with clear inner areas, the scarcity of polysomes and endoplasmic reticulum in the cytoplasm agree with the idea of Reed and Stanley [23] (1972), that there is an active transcription process in this phase. The large nuclear surface, determined by the great lobulation of the nucleus in spermatogonia I evidences a high degree of nuclear-cytoplasmic interaction (Reed e Stanley [23], 1972). In this phase the transcribed RNA is probably transfered to the cytoplasm to become part of the ribosomes found in later phases.

Spermatogonia II show structural characteristics similar to those described by Kalt [11] (1973) in *Xenopus laevis*.

The meiotic prophase of *Odontophrynus americanus* in its general structural aspect, is similar to that of *Xenopus laevis* (Reed and Stanley [23], 1972; Kalt [11], 1973).

Synaptonemal complex

Comparison of the synaptonemal complex ultrastructure in a great number of sections obtained from various specimens, allowed the conclusion that the synaptonemal complexes of the 2n and 4n are similar.

Through light microscope observations it was possible to observe that *Odontophrynus americanus* homologue chromosomes pair only at the ends and in a bouquet-like configuration (Beçak, M. L. et al. [2], 1967). The electron microscope shows evidence of this bouquet-like configuration, but it seems that the pairing occurs not only at the homologue's ends, but also at those distant zones of the nuclear membrane where they normally attach.

No double synaptonemal complexes or polycomplexes were observed in the phases studied in this paper. However, Comings and Okada (personal communication, 1971), examining the same material found polycomplexes, not associated with the homologues, in cells in diplotene and diakynesis. Likewise, in the autotetraploid *Lilium longiflorum* only single synaptonemal complexes appear (Moens [18, 20], 1968, 1970). In this plant, serial sections of sporocytes I allow the observation of an interchange of lateral elements between two bivalents, probably homologues. The formation of the synaptonemal complex is first evidenced when axial elements are seen close together in zygotene. According to Moens [19] (1969), pairing is induced through a still unknown process, and only when the homologues attain a distance of about 300 nm. In *Odontophrynus americanus* the distance between the polarized homologue terminals in zygotene is quite small, facilitating the formation of the synaptonemal complex.

Chromatin condensation is already observed in the phase preceding the pairing although the axial elements are not yet visible. According to Moses [21], 1968, axial elements can be observed only when the chromatin attains a sufficient degree of condensation to enable an alignment of the proteic material settled on it. In the phases where the synaptonemal complexes are more evident, the perinuclear electron-dense formations mentioned before, appear in higher numbers. Similar but larger structures were observed in oocytes I of amphibians

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

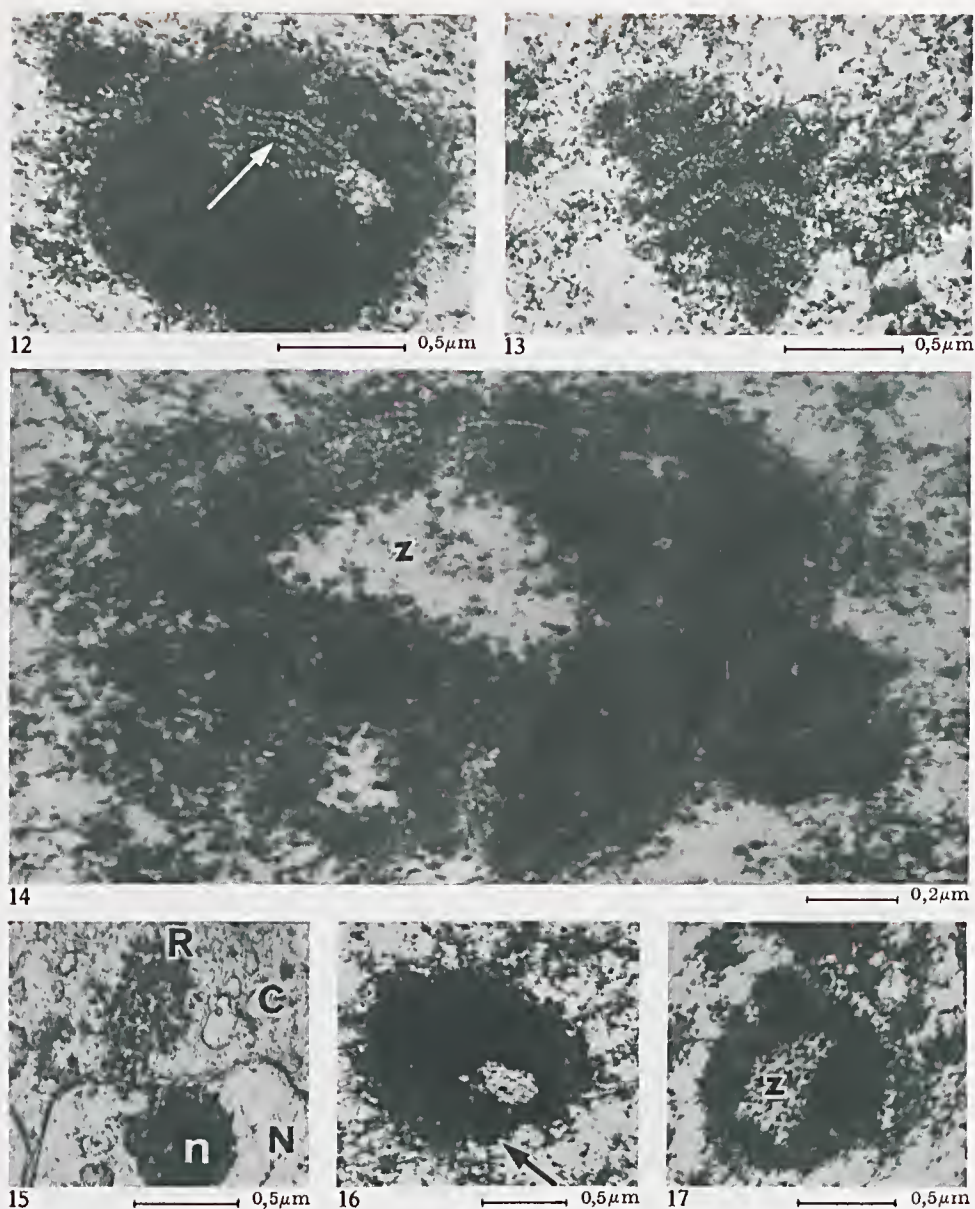



Fig. 12 - Compact nucleolus with a lamellar electron dense component (arrow) from a leptotene spermatocyte (2n).

Fig. 13 - Nucleolus from an early zygotene spermatocyte presenting nucleoloneme in a parallel array.

Fig. 14 and 17 - Nucleolus (2n and 4n) from zygotene spermatocytes with a large central clear zone (z).

Fig. 15 - Portion of a nucleolus (n) from spermatogonium I, close to the nuclear membrane. A ribosome aggregate (R) located in the cytoplasm at the opposite side of the nucleolus.

Fig. 16 - Nucleolus from spermatogonium II with polygonal electron dense components (arrow) and a small clear zone.

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

by Eddy & Ito [9] (1971). These authors suggest that these structures are formed by proteic material of nuclear origin; they do not exclude, however, the possibility of a RNA constituent. Clérot [7] (1968) observed these structures in spermatocytes I of *Rana*, which in this case are always associated with groups of mitochondria, and supposedly related to their biogenesis.

In *Odontophrynus americanus*, the following characters suggest a nuclear origin of this material:

— round perinuclear electron-dense bodies are always near or associated to nuclear membrane pores;

— electron density of the composing material is similar to that of chromatin;

— material of the same electron density is also found within the pores.

It is known that in oocytes I of amphibians an extra synthesis of nuclear DNA normally occurs, corresponding to the amplification of the DNA in ribosomal cystrons, giving rise to the multiple micronucleoli that migrate to the nuclear periphery (Painter and Taylor [22], 1946; Gall [10], 1967). In *Acheta*, Lima de Faria et al. [16] (1969) affirmed that there is a relationship between the formation of polycomplexes associated to certain structures in oocyte I, and the amplification of their DNA.

Based on these data, a possible analogy is suggested between the perinuclear formations observed in *Odontophrynus americanus* spermatocytes I, and the RNP granules described in oocytes I of amphibians. In spermatocytes, these structures may be the product of a small genic amplification, perhaps due to the preservation of an evolutive character, more favorable in the female germ line.

Hence, based on the findings of Lima de Faria et al. [16], 1969, it also could be suggested that in *Odontophrynus americanus* exists a relationship between the synaptonemal complex formation, and the appearance of the dense perinuclear structures since both are probably related to a genic amplification.

Nucleolus and paracrystalline body

Clear zones filled with dense granules suggest that there is a more intense nucleolar activity in spermatogonia I, and during zygotene. The nucleoli assume a ring-like configuration at the end of zygotene, as observed also in *Triturus*, at the time of the highest synthetic activity (Lane [15], 1967).

Lamellar and polygonal forms seen in the compact nucleoli of spermatogonia II, and in nucleoli of cells in leptotene, had not been reported before in male germ cells.

Occurrence of paracrystalline bodies in spermatogenesis as a result of a nucleoprotein polymerization is relatively rare (Yasuzumi et al. [27], 1970). According to Moses [21] (1968) there is a trend for chromatin and other substances to occur in periodical arrays in the nucleoplasm of gametogenic cells. Wettstein and Sotelo [28] (1965) related the evolution of a periodical structure to a hexagonal pattern in spermatocytes I of an Arachnida. The possibility can not be excluded, however, that the paracrystalline structure is a virus aggregate.

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

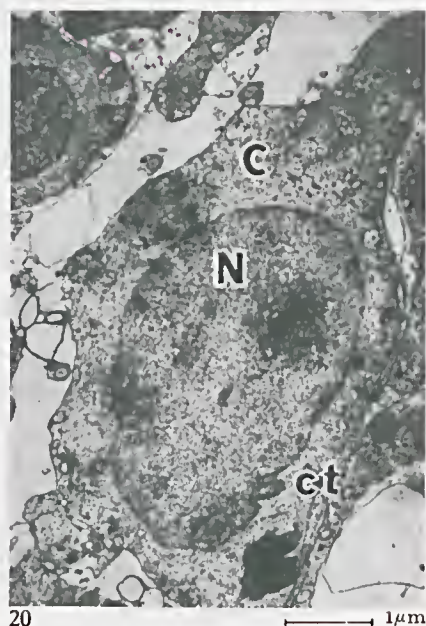
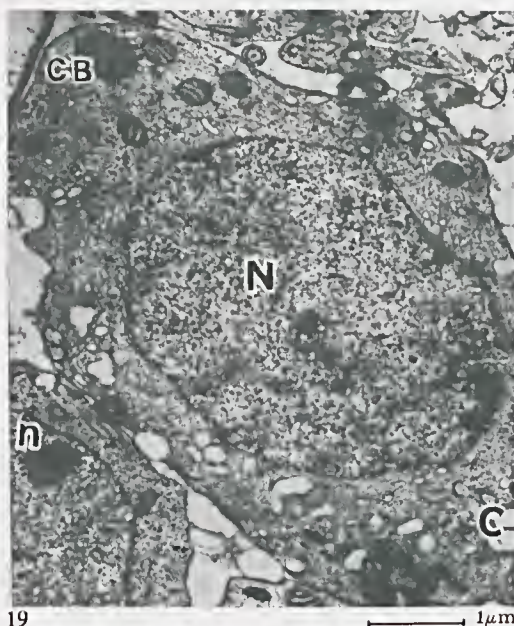
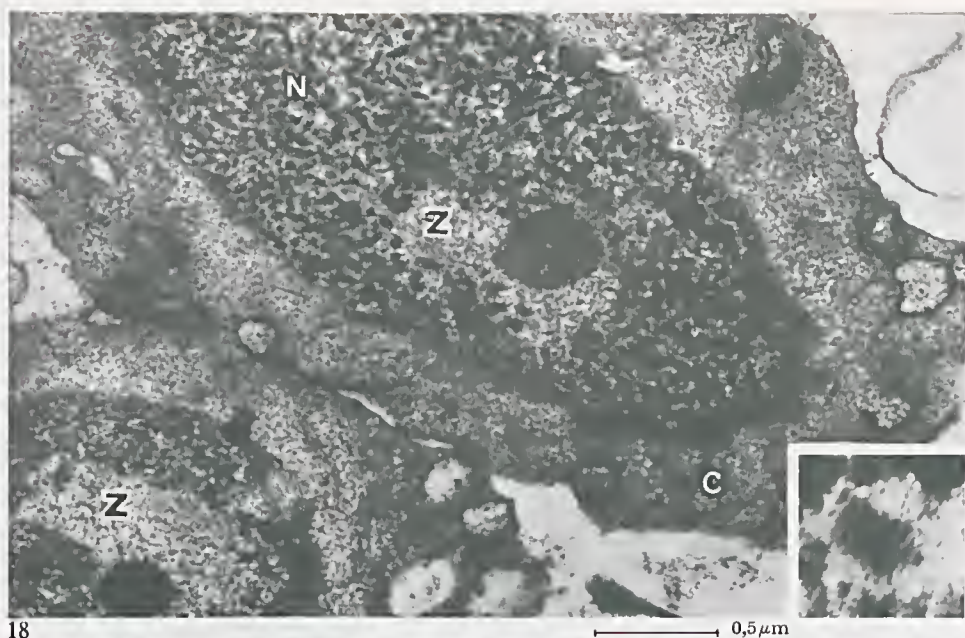



Fig. 18 - Maturing spermatid with condensed granular chromatin and a clear zone (z) where normally appears a compact nucleolus. The upper spermatid presents a paracrystalline body.
Inset: Longitudinal section of another paracrystalline body at higher magnification, with alternated clear and dense bands.

Fig. 19 and 20 - Early spermatids (2n). The nucleus (N) presents a compact nucleolus (n), and a fine granular chromatin more condensed at some regions. Cytoplasm (C) contains: centriolus (ct) next to a small depression of the nuclear membrane; chromatoid body (c.b.), flattened, electron dense vesicles at the cytoplasm periphery, and polysomes.

Chromatoid bodies

The chromatoid body of *Odontophrynus americanus* is similar to that described by Kalt [11] (1973), also named "nucleolar-like body". As Kalt, we did not obtain any evidence that the chromatoid body is related to the nucleolus, since we did not find any relationship between these two structures. The function of the chromatoid body is unknown, and in amphibians there is no evidence that they partake in the formation of spermatozoa as they do in mammals.

Annulate lamellae

The proximity of annulate lamellae to cytoplasmic vesicles could suggest that they are formed by a linear aggregation of the latter as already observed by Kessel [13] (1968).

During spermiogenesis, the nucleus decreases in volume by chromatin condensation, and consequently, elimination of a part of the nuclear membrane must occur. This could be due to the deletion of small segments in form of vesicles aggregating in a linear and parallel array in the cytoplasm. In the spermatids a great part of the cytoplasm is also eliminated. In fact, degenerating material as well as many membranous structures are seen in peripheric position. The annulate lamellae observed in spermatogonia I may likewise be explained: the nuclear surface is very large due to the great lobulation of the nucleus and, a chromatin condensation would be necessary to provoke the division for spermatogonia II formation, resulting consequently in a reduction of the nuclear volume and nuclear membrane surface, part of which is then eliminated.

Acknowledgements: The author wishes to thank Dr. Maria Luiza Beçak and Dr. Willy Beçak for their helpful orientation and assistance during the course of this investigation; Dr. A. Brunner Jr. for his orientation in the field of Electron Microscopy; Miss Clara Y. Mitsutami, for her technical aid; Mrs. Sibylle Heller for the editorial aid and translation.

RESUMO: Foi feito um estudo ultra-estrutural das células germinativas masculinas de *Odontophrynus americanus* (Amphibia — Anura, Ceratophrydidae) diplóides e tetraplóides, desde a fase de espermatogônia I, até o início da espermiogênese. A espermatogênese, quanto ao aspecto ultra-estrutural, é semelhante nas populações diplóides e tetraplóides.

O pareamento dos quatro cromossomos homólogos nos animais 4n ocorre dois a dois, com a formação de complexos sinaptônêmicos simples.

UNITERMOS: espermatogênese, espermatócitos, complexo sinaptonêmico.

REFERENCES

1. BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W. & RABELLO, M.N. Cytological evidence of constant tetraploidy in the bisexual South America frog *Odontophrynus americanus*. *Chromosoma* (Berl.), *19:* 188-193, 1966.

CARNEIRO, S.M. Observations on the germ cell ultrastructure of male diploid and tetraploid *Odontophrinus americanus* (*Amphibia: Anura*).
Mem. Inst. Butantan, 39: 135-148, 1975.

---

2. BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W. & RABELLO, M.N. Further studies on polyploid Amphibians (Ceratophrydidae). I. Mitotic and meiotic aspects. *Chromosoma* (Berl.), *22:* 192-201, 1967.

3. BEÇAK, M.L.; BEÇAK, W. & VIZOTTO, L.D. A diploid population of the polyploid Amphibian *Odontophrynus americanus* and an artificial intraspecific triploid hybrid. *Experientia* (Basel), *26:* 545-546, 1970.

4. BURGOS, M.H. & FAWCETT, D.W. An electron microscope study of spermatid differentiation in the toad *Bufo arenarum* Hensel. *J. biophys. biochem. Cytol., 2:* 223-240, 1956.

5. BURGOS, M.H. & MANCINI, R.E. Rev. Soc. Argent. Biol., *24:* 328, 1948. Apud Burgos e Fawcett, 1956.

6. BURGOS, M.H. & VITALE-CALPE, R. The fine structure of the Sertoli cell-spermatozoan relationship in the toad. *J. Ultrastr. Res., 19:* 221-237, 1967.

7. CLEROT, J.C. Mise en évidence par cytochimie ultrastructurale de l'émission de protéines par le noyau d'auxocytes de Batraciens. *J. Microsc., 7:* 973-992, 1968.

8. COIRO, J.R.; WEIGL, D.R.; KISELIUS, J.; MENEZES, H. & BILLOTA, A.T. A new embedding medium (Polylite 8001) for biological material. *Ciência e Cultura, 24:* 660-662, 1972.

9. EDDY, E.M. & ITO, S. Fine structural and radioautographic observations on dense perinuclear cytoplasmic material in tadpole oocytes. *J. Cell Biol., 49*: 90-108, 1971.

10. GALL, J. Synthesis of nucleolar DNA in amphibian oocytes. *J. Cell Biol., 35:* 43-A, 1967.

11. KALT, M.R. Ultrastructural observations on the germ line of *Xenopus laevis*. *Z. Zellforsch., 138:* 41-62, 1973.

12. KELLENBERGER, E.; RYTER, A. & SECHAND, J. Electron microscope study of DNA containing plasma. II. Vegetative and nature phage DNA as compared with normal bactcrial nucleoids in different physiological states. *J. biophys. biochem. Cytol., 4:* 671-677, 1958.

13. KESSEL, R.G. Annulate lamellae. *J. Ultrastr. Res.* (Suppl.), *10:* 5-82, 1968.

14. KING, H.D. *Amer. J. Anat., 7* (3), 1907. Apud Saez e cols., 1936.

15. LANE, N.J. Spherical and ring nucleoli in amphibian oocytes. (Patterns of uridine incorporation and fine structural features). *J. Cell. Biol., 35:* 421-434, 1967.

16. LIMA DE FARIA, A.; BIRNSTIEL, M. & JAWORSKA, H. Amplification of ribosomal cistrons in the heterochromatin of *Acheta*. *Genetics* (Suppl.) *61:* 145-159, 1969.

17. MILLONIG, G. Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation. *J. Appl. Physiol., 32:* 1637, 1961.

18. MOENS, P.B. The structure and function of the synaptonemal complex in *Lilium longiflorum* sporocytes. *Chromosoma* (Berl.), *23:* 418-451, 1968.

19. MOENS, P.B. The fine structure of meiotic chromosome polarization and pairing in *Locusta migratoria spermatocytes*. *Chromosoma* (Berl.), *28:* 1-25, 1969.

20. MOENS, P.B. The fine structure of meiotic chromosome pairing in natural and artificial *Lilium* polyploids. *J. Cell Sci., 7:* 55-63, 1970.

21. MOSES, M.J. Synaptonemal Complex. *Ann. Rev. Genet., 2:* 104-175, 1968.

22. PAINTER, T.S. & TAYLOR, A.N. Nucleic acid storage in the toad's egg. *Proc. Nat. Acad. Sci.* (Wash), *28:* 311-317, 1942.

23. REED, S.C. & STANLEY, H.P. Fine structure of spermatogenesis in the South African clawed toad *Xenopus lacvis* Daudin. *J. Ultrastr. Rcs., 41:* 277-295, 1972.

24. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol., 17:* 208-212, 1963.

25. SAEZ, F.A.; ROJAS, P. & DE ROBERTIS, E. Investigaciones sobre las celulas sexuales de los Anfibios Anuros. El processo meiotico en *Bufo arenarum* Hensel. *Rev. del Inst. del Museo de la Univ. Nac. de La Plata, 2:* 95-143, 1936.

26. SANDOZ, D. Étude cytochimique des polysaccharides au cours de la spermatogenèse d'un amphibien anoure: le Discoglosse, *Discoglossus pictus* (O). *J. Microsc., 9:* 243-262, 1970.

27. YASUZUMI, G.; SUGIOKA, T.; TSUBO, I. & MATANO, Y. Spermatogenesis in animals, as revealed by electron microscopy: XIX. Peculiar granular body clusters in early spermatid nuclei of grasshopper. *Z. Zellforsch., 109:* 450-464, 1970.

28. WETTSTEIN, R. & SOTELO, J.R. Electron microscope study on the meiotic cycle of *Acaniopachylus aculeatus* (Arachnida: Opiliones). The composite bodies of primary spermatocytes. *Chromosoma* (Berl.), *17:* 246-257, 1965.

29. ZIRKIN, B.R. The fine structure of nuclei during spermiogenesis in the leopard frog *Rana pipiens. J. Ultrastr. Res., 34:* 159-174, 1971.

Recebido para publicação em 27-6-75 e aceito cm 6-8-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 149-155, 1975

CHROMATIN EXTRUSION MECHANISM IN AVIAN ERYTHROCYTES (*GALLUS GALLUS*) AND ITS POSSIBLE SIGNIFICANCE. *

JOSÉ RAFAEL R. COIRO and ADOLPHO BRUNNER Jr.
Laboratory of Electron Microscopy, Instituto Butantan

ABSTRACT: The detection through supravital staining of bodies close to or distant from the nucleus of avian erythrocytes, led to the study of their origin and significance by the Feulgen reaction, hemolysis in smears, and ultrathin sections. By those methods it was confirmed that the bodies are vesicles of mitochondrial origin which received chromatinic material into their interior, and later acquired an aberrant ultrastructure. Fixaton in a glutaraldehyde gradient followed by osmium tetroxide facilitated the visualization of hemoglobinized cytoplasm passages into the nucleus, through the nuclear membrane pores. In this paper, the phenomena of hemoglobin penetration and chromatin extrusion in chicken erythrocytes are discussed.
UNITERM: Chromatin extrusion mechanism in avian erythrocytes.

INTRODUCTION

Davies [16] (1961), Wilt [29] (1962), and Grasso et al [18] (1962) detected hemoglobin within vertebrate erythrocyte nuclei. Hammel et al. [19] (1963) suggested that the final hemoglobin biosynthesis could occur within the nuclei of avian erythrocytes. However, Coiro et al. [13] (1973), and Brunner et al. [6,5] (1972, 1973) demonstrated in chickens and mammals, respectively, that the final biosynthesis occurs in organelles termed hemosomes.

Tooze & Davies [28] (1963) proposed that hemoglobin within the nuclei could act in the same manner as histone, furthering a complete nuclear DNA condensation. Thus, hemoglobin would be able to interrupt heme and globin synthesis through a negative retroalimentation mechanism (Granick & Levere [17], 1968).

---

* This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisas (Proc. 11.263/74 and 10.112/71) and Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan.
Address: Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

COIRO, J.R.R. & BRUNNER Jr., A. Chromatin extrusion mechanism in avian erythrocytes (*Gallus gallus*) and its possible significance.
Mem. Inst. Butantan, 39: 149-155, 1975.

In mammals it is possible to observe hemoglobin presence in immature erythrocytary forms as polychromatophile and orthochromatic erythroblasts. In the less immature stage of orthochromatic erythroblasts it is observed that these cells acquire cytoplasmic expansion and contraction movements, with posterior extrusion of the nucleus with its chromatinic material (Jolly [20], 1907; Comandon & Jolly [15], 1923; Bessis & Bricka [1], 1952; Rind & Stobble [27], 1957).

The two main objectives of this paper are to evidence and discuss: a) that the Feulgen-positive vesicles originate from mitochondria juxtaposed on the nuclear membrane in order to receive chromatinic material; b) that the intranuclear hemoglobin present in the erythrocytes probably does not act as histone with regard to the blocking of genic activity in the nucleus.

MATERIAL AND METHODS

Blood of normal adult chickens was collected from the marginal vein of the wing or by cardiac puncture, using an anticoagulant constituted of 0.75ml 2% EDTA, and 0.25ml 4% $NaHCO_3$, in a 0.1ml/5ml ratio.

Supravital staining

Cells were stained at a ratio of one blood drop to nine drops of 0.1% brilliant cresyl blue in 0.85% saline, and suspended for 1 min.

Modified Feulgen reaction (Lison [21], 1960).

Reaction was carried out in accordance with the original indications from the authors, except for the fixation. Methanol was used for 3 min in whole smears. Control by the treatment through DNase was carried out in O.67M phosphate buffer with 0.003M $MgSO_4$ (pH 6.5).

Hemolysis of blood smears

Thin blood smears were prepared on collodion-coated histological slides and allowed to dry at room temperature for 18-20 h; hemolysis was performed in a 0.8% sodium chloride solution containing 2.5% $^V/v$ of concentrated formalin. The smears were then stained for 5 min in an 1% aqueous phosphotungstic acid solution, washed in distilled water and dried at room temperature. The films were transferred to copper grids and submitted to the chadow-casting process with palladium (Brunner & Vallejo-Freire [7], 1956). Also a 25% aqueous glutaraldehyde solution was used at 2.5 $^V/v$ instead of concentrated formalin (Coiro, Brunner & Mitsutani [12], 1974).

Fixation and embedding for thin sectioning

Fixation in a glutaraldehyde gradient followed by osmium tetroxide (Brunner & Coiro, [3] 1973) in Millonig buffer (pH 7.3) (Millonig [25], 1961). Two fixing solutions were prepared, the first with 2% glutaraldehyde (A), and the second with 1% (B). Twelve drops of solution *A* were added drop by drop, each followed by slight agitation, to an equal volume of blood mixed with the

anticoagulant. After 30 min, the blood fixed in solution *A* was mixed with the solution *B*, proceeding the fixation for 2 h.

Direct fixation in potassium permanganate followed by osmium tetroxide in veronal-acetate buffer (pH 7.3). For this method of fixation, blood was harvested in 3.8% sodium citrate. Washings were carried out in the buffer; a final fixation with 1% osmium tetroxide was done for 30 min.

Staining was done in an 1% aqueous uranyl acetate solution for 30 min, except for the cells directly fixed in potassium permanganate. Dehydration was achieved in the alcohol series followed by acetone as intermediate medium, and embedding in Polylite 8001 (Coiro & Brunner [11], 1972). Ultrathin sections were obtained in a Porter-Blum MT-1 ultramicrotome, and the final staining was achieved with lead citrate (Reynolds [26], 1963). All preparations were examined in UM 100b, and Elmiskop I electron microscopes with magnifications of X 1,300 - 40,000 at 60, and 80 Kv.

RESULTS

Light microscopy

Whole normal adult avian blood supravitally stained with brilliant cresyl blue shows erythrocytes with refringent bodies, close to or distant from the nucleus, varying in number from 1 to 3, with a predominant frequency of two per erythrocyte. In some erythrocytes, bodies are observed closely contacting the nuclear periphery, showing the same dye-affinity as the intranuclear material.

Through Feulgen reaction it was verified that some of the bodies present in the cytoplasm, more or less distant from the erythrocyte nucleus, are positive. In the DNase treated control smears none of the erythrocytes shows any Feulgen positive cytoplasmic structure.

Electron microscopy

In hemolysed smears there appears a marked number of stromas containing bodies with dimensions between 0.42 x 0.64, and 0.88 1.2μ, and apparently with the same nuclear density. These components appear at several points, in numbers varying from 1-3, generally two per stroma (Fig. 1). Excepting these dense forms, the stroma shows itself free of structures that could suggest the presence of whole organelles.

The material fixed in potassium permanganate followed by osmium tetroxide shows vesicles at various cytoplasmic sites. In some instances, the configuration suggests a continuity between the vesicle and the nucleus (Fig. 2). However, cells fixed in a glutaraldehyde gradient followed by osmium tetroxide show mitochondria close to an already pycnotic nucleus. Such mitochondria receive chromatinic material into their interior, at the same time when, through the nuclear membrane's pore, the passage of hemoglobinized cytoplasm to the nucleus can be observed (Figs. 3,4). The cytoplasm does not show any more polysomes, but monosomic forms can be present or not at all.

COIRO, J.R.R. & BRUNNER Jr., A. Chromatin extrusion mechanism in avian erythrocytes (*Gallus gallus*) and its possible significance.
Mem. Inst. Butantan, 39: 149-155, 1975.

DISCUSSION

Whole cells when supravitally stained show more or less spherical forms. Comparatively, the position is identical to that of Feulgen positive bodies, as well as to the dense bodies observed in hemolysed smears.

In ultrathin sections it was possible to observe a simple connection between the vesicle and the nucleus, or a visible continuity between them, in such a way that at certain points the filamentous or quite condensed chromatin is seen to pass into the mitochondria, as in Figs. 3 and 4. Coiro[9] (1972) and Menezes et al[22] (1972), observed by light microscopy Feulgen positive vesicles in erythrocytes of *Gallus gallus, Bufo ictericus,* and *Liophis miliaris miliaris,* apparently originating from the nucleus. Brunner et al.[4] (1975), examining the peripheric blood of adult carps (*Cyprinus carpio*) observed that mitochondria juxtapose themselves on the nuclear membrane in order to receive chromatinic material, showing thus the unequivocal mitochondrial origin of those vesicles. Carvalho dos Santos[8] (1974) in *Bufo,* Coiro[10] (1974) in chickens and Menezes et al.[24] (1974) in 5 species of *Bothrops,* demonstrated the identity of the vesicle's origin based on the findings in *C. carpio.* These morphological observations were corroborated by ^{3}H-tymidine labelling of nuclei and vesicles of mitochondrial origin in *Bufo* (Menezes et al.[23], 1974; Coiro et al.[14], 1974).

Considering the elimination of a chromatinic fraction, that would displace itself from the nucleus into the mitochondria (Fig. 4), perhaps it could be suggested that this loss is somehow related to the chromosomic function, blocking the genic activity of the nucleus. This hypothesis is supported by the fact that the chromatinic elimination occurs simultaneously to the end of the hemoglobin synthesis, polysome degradation, as well as a determined inhibition of the nuclear activity, where chromosomes become heteropycnotic.

By comparison it may be infered that losses of chromatinic material in chickens and mammals, in the latter by a complete extrusion of the nucleus, are possibly correlated phenomena, although different as regards the hemoglobin synthesis periods of time, considering that while the reticulocyte is engaged in intense synthesis, there occurs a chromatin loss in chicken erythrocytes concomitant to the cessation of globin synthesis.

All those observations suggest that the problem of the DNA activity blocking during maturation is also related to a chromatin reduction, and would not occur through a simple negative retroalimentation mechanism. Admitting that the hemoglobin present in the nuclei acts as histone, condensing the nuclear DNA (Tooze & Davies[28], 1963), it is obvious that a synthesis blocking would occur already during the immature phases, since mammal and avian erythroblats present a considerable level of intranuclear hemoglobin. However, this hypothesis has no support on the fact that at this period of time the cells of mammals (Borsook et al.[2], 1968) and chickens develop and intense hemoglobin synthesis.

The presence of intranuclear hemoglobin seems to be more related to physical phenomena, such as molecular pressure. As in Fig. 3, membrane pores, giving way to pressure, would allow the passage of hemoglobinized cytoplasm into the nucleus.

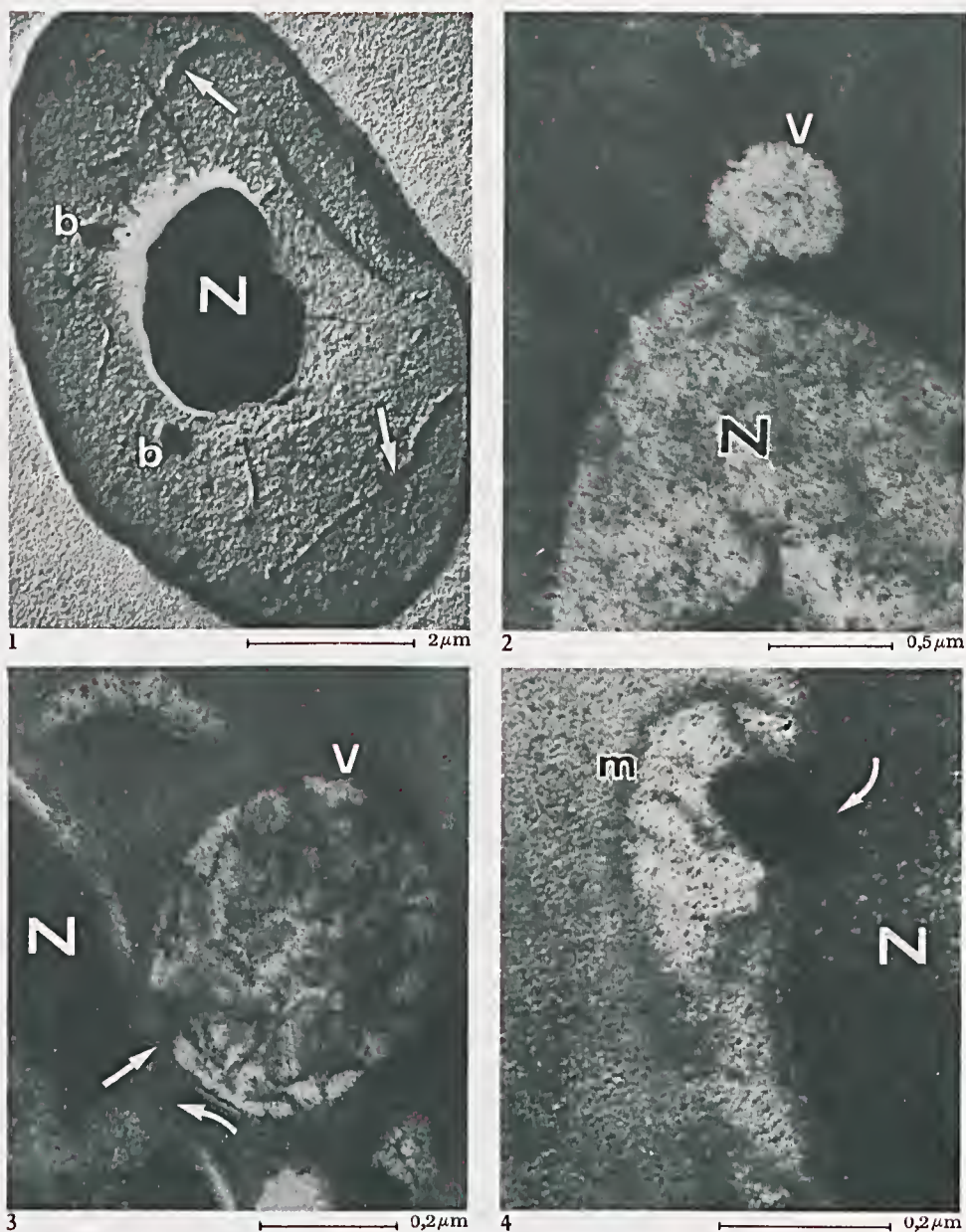
COIRO, J.R.R. & BRUNNER Jr., A. Chromatin extrusion mechanism in avian erythrocytes (*Gallus gallus*) and its possible significance.
Mem. Inst. Butantan, 39: 149-155, 1975.

CHICKEN ERYTHROCYTES

Fig. 1 - Hemolyzed erythrocyte showing folds (arrows), electron dense bodies (b) and nucleus (N).

Fig. 2 - Direct fixation in potassium permanganate followed by osmium tetroxide. Vesicle (V); nucleus (N).

Fig. 3 - Fixation in a glutaraldehyde gradient followed by osmium tetroxide. Vesicle (V); arrows show passage of chromatin filaments into the vesicle (V), and hemoglobinized cytoplasm into the nucleus through the nuclear membrane pores; nucleus (N).

Fig. 4 - Fixation in a glutaraldehyde gradient followed by osmium tetroxide. Mitochondrion receiving dense chromatinic material (arrows); nucleus (N).

COIRO, J.R.R. & BRUNNER Jr., A. Chromatin extrusion mechanism in avian erythrocytes (*Gallus gallus*) and its possible significance.
Mem. Inst. Butantan, 39: 149-155, 1975.

Acknowledgements: The authors wish to thank Mrs. Vera Mondin Weisz, Mr. Alípio Silva Gonzales, Heitor Costa and Carlos Alberto Gonçalves Silva for their technical assistance, and Mrs. Sibylle Heller for translation.

RESUMO: A constatação de corpos próximos ou distantes do núcleo de eritrócitos de aves, levou a estudar sua origem e significância através da reação de Feulgen, hemólise em esfregaço e cortes ultrafinos. Ficou confirmado através dos métodos utilizados, que os corpos são de origem mitocondrial, que recebem material cromatínico para o seu interior e, mais tarde, adquirem uma ultra-estrutura aberrante, vesiculosa. A fixação em gradiente de glutaraldeído seguido pelo tetróxido de ósmio, facilitou a visualização da passagem de citoplasma hemoglobinizado para o interior do núcleo, bem como a penetração de cromatina, altamente condensada, para os mitocôndrios justanucleares. Neste trabalho, os fenômenos da penetração de hemoglobina e extrusão cromátinica em eritrócitos de aves são discutidos.

UNITERMO: Extrusão cromatínica em eritrócitos de aves.

REFERENCES

1. BESSIS, M. & BRICKA, M. Aspect dynamique des cellules du sang. Son étude par la microcinématographie en contraste de phase. *Rev. Hémat., 7:* 407-435, 1952.

2. BORSOOK, H., HEIGLER, D. & GUNDERSON, A. Different patterns of protein and hemoglobin synthesis before and after terminal differentiation in adult rabbit marrow. *Arch. Biochem., 125*: 439-435, 1968.

3. BRUNNER JR., A. & COIRO, J.R.R. Fixation of erythrocytes in a glutaraldehyde gradient, followed by osmium tetroxide. *An. Acad. brasil. Ciênc., 45* (3/4): 678-679, 1973.

4. BRUNNER JR., A., COIRO, J.R.R., MENEZES, H., MITSUTANI, C.Y. & CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. Vesicles carrying nuclear material in mature *Cyprinus carpio* erythrocytes. *Experientia* (Basel), *31:* 531-532, 1975.

5. BRUNNER JR., A., COIRO, J.R.R., SCHWANTES, M.L. & SCHWANTES, A.R. Hemosome and hemoglobin biosynthesis in embryos and in regressive anemias. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 335-344, 1973.

6. BRUNNER JR., A., SCHWANTES, A.R., SCHWANTES, M.L. & BEÇAK, W. Hemoglobin in immature erythrocyte mitochondrion-like organelles. *Experientia* (Basel), *28:* 569-571, 1972.

7. BRUNNER JR., A. & VALLEJO-FREIRE, A. Electron microscopic observations on granules and filaments (reticulosomes) of reticulocytes. *Exp. Cell Res., 10:* 55-62, 1956.

8. CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. Personal communication. (1974).

9. COIRO, J.R.R. Unpublished observation. (1972).

10. COIRO, J.R.R. Estudo comparativo da ultra-estrutura de elementos da série eritrocitária de aves e mamíferos. Correlação com a biossíntese de hemoglobina. São Paulo, 1974. [Tese Un. São Paulo].

COIRO, J.R.R. & BRUNNER Jr., A. Chromatin extrusion mechanism in avian erythrocytes (*Gallus gallus*) and its possible significance.
Mem. Inst. Butantan, 39: 149-155, 1975.

---

11. COIRO, J.R.R. & BRUNNER JR., A. Polylite 8001: A new embedding medium for electron microscopy. *Rev. microsc. Electr., 1*(1): 12, 1972.

12. COIRO, J.R.R., BRUNNER JR., A. & MITSUTANI, C.Y. Unpublished observations (1974).

13. COIRO, J.R.R., BRUNNER Jr., A., SCHWANTES, M.L. & SCHWANTES, A.R. Hemoglobin in mitochondrion-like organelles of immature chick embryo erythrocytes. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 327-333, 1973.

14. COIRO, J.R.R., MENEZES, H., MITSUTANI, C.Y., CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. & BRUNNER JR., A. Chromatin extrusion in erythrocytes of *Gallus, Bothrops, Bufo* and *Cyprinus* species, and its significance. II.º Congresso Latino Americano de Microscopia Eletrônica e IV.º Colóquio Brasileiro de Microscopia Eletrônica. Ribeirão Preto (S. Paulo), 1974.

15. COMANDON, J. & JOLLY, J. In: Traité techniques d'hematologie. Paris, Maloine, 1923. v. 2.

16. DAVIES, H.G. Structure in nucleated erythrocytes. *J. Biophys. Biochem. Cytol., 9:* 671-687, 1961.

17. GRANICK, S & LEVERE, R.D. Sintesis del hem en las células eritroides. *In:* Moore, C.V. & Brown E.B. Progresos en hematologia. Barcelona, Editorial Científico-Médica, 1968. v. 2, p. 31.

18. GRASSO, A., SWIFT, H. & ACKERMAN, G.A. Observations on the development of erythrocytes in mammalian fetal liver. *J. Cell Biol., 14:* 235-254, 1962.

19. HAMMEL, C.L., RASMUSSEN, P. & BESSMAN, S.P. Hemoglobin synthesis. A nuclear function in the avian erythrocytes. *J. Cell Biol., 19:* 31-A, 1963.

20. JOLLY, J. Recherches sur la formation des globules rouges des mammifères. *Arch. Anat. micr. Morph. exp., 9:* 133-314, 1907.

21. LISON, L. Histochimie et Cytochimie Animales. Principes et méthodes. Paris, Gauthier-Villars, 1960. v. 2, p. 736.

22. MENEZES, H., COIRO, J.R.R. & BRUNNER JR., A. Vesículas FEULGEN positivas de *Bufo, Gallus* e *Liophis.* Reun. Extraord. da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, (São Paulo) 1972.

23. MENEZES, H., MITSUTANI, C.Y. & BRUNNER JR., A. Unpublished observations, 1974.

24. MENEZES, H., MITSUTANI, C.Y., COIRO, J.R.R., CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. & BRUNNER JR., A. Ultrastructure of mature erythrocytes from five Bothropic species. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 51-62, 1974.

25. MILLONIG, G. Advantages of a phosphate buffer for OsO_4 solutions in fixation. *J. Appl. Phys., 32*(8): 1637, 1961.

26. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol., 17:* 209, 1963.

27. RIND, H. & STOBBE, H. Über reife und unreife Retikulozyten. *Folia Haemat., 1:* 219-229, 1957.

28. TOOZE, J. & DAVIES, H.G. The occurence and possible significance of haemoglobin in the chromosomal regions of mature erythrocyte nuclei of the newt *Triturus cristatus cristatus. J. Cell Biol., 16:* 501-511, 1963.

29. WILT, F.H. The ontogeny of chick embryo hemoglobin. *Proc. Nat. Acad. Sci., 48:* 1582-1590, 1962.

Recebido para publicação em 16.IV.1975 e aceito em 28.IX.1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 157-168, 1975

ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF MATURE *CYPRINUS CARPIO* ERYTHROCYTES. *

ADOLPHO BRUNNER JR., JOSÉ RAFAEL R. COIRO,
CLARA Y. MITSUTANI, MARIA ANGÉLICA S. CARVALHO
DOS SANTOS and HÉRCULES MENEZES
Laboratory of Electron Microscopy, Instituto Butantan

ABSTRACT: Mature *Cyprinus carpio* erythrocytes show a phenomenon of Feulgen positive vesicle formation, begining from a mitochondrion juxtaposed at the nuclear membrane. While condensed chromatin enters the mitochondrion, modifications occur in the lamellar inner structure of the organelle, giving rise to a vesicle which detaches from the nucleus and displaces itself through the cytoplasm. Some aspects suggest that the vesicle content is expelled from erythrocytes. It seems that this is a general event for other mature nucleated vertebrate erythrocytes. Other vesicles of unknown origin, some originating from degenerated mitochondria, and others from the nuclear membranes, were found.

A dense amorph material, never found in erythrocytes of other vertebrates, was frequently present in the nucleoplasm, and in the cytoplasm associated to the smooth endoplasmic reticulum. Marginal bands, thinner than those found in erythrocytes of other groups, were observed.

UNITERM: Ultrastructure of *Cyprinus carpio* erythrocytes.

INTRODUCTION

Information is scarce on the cytology of mature fish erythrocytes, especially at the ultrastructural level. Concerning the mature erythrocytes of other vertebrates, except mammals, there are only a few interesting references with regard to the ultrastructure of mature chicken [6,9], bothropic species [14], amphibians [5,6,10,19,21] and toadfish [10] erythrocytes.

---

* This research has been supported by the Conselho Nacional de Pesquisas (Proc. 10.112/71 and 11.268/74) and Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan.
Address: Caixa postal 65 - S. Paulo - Brazil

BRUNNER, J., A., COIRO, J.R.R., MITSUTANI, C.Y., CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. & MENEZES, H. Ultrastructural aspects of mature *Cyprinus carpio* erythrocytes. *Mem. Inst. Butantan, 39*: 157-168, 1975.

The structural components of mature erythrocytes differ from group to group, depending on the physiological behaviour of the respective specimens. However, such components as the marginal band [6, 9, 10, 14, 19, 21], and vesicles carrying chromatinic material [2,5,6,14], are common occurrences in all mature nucleated erythrocytes.

This paper reports on the ultrastructure of mature *Cyprinus carpio* erythrocytes in comparison with findings in other nucleated erythrocytes.

MATERIAL AND METHODS

Blood samples were obtained by cardiac puncture from adult specimens free of hemoparasites, without the use of anticoagulants, or using 10% $^{V}/v$ of 2% EDTA solution adjusted to pH 7.3 — 7.4 by the addition of a 4% $NaHCO_3$ solution, resulting in a final concentration of 0.15% anticoagulant.

Rosenfeld staining

This staining according to Rosenfeld [17], has been employed for the evaluation of the general hematological aspects, and to assure the absence of parasitism.

Supravital staining

One drop of blood was added to 10 drops of a 0.65% NaCl solution, containing 0.1% brilliant cresyl blue, to evaluate the proportion of erythrocytes with basophilic reticulum.

Feugen reaction

In an attempt to verify whether the erythrocyte vesicle content could be in part DNA, thin blood smears were submitted to the reaction according to Lison [12]. Control smears were previously treated by 0.5% DNase in O.1M phosphate buffer (pH7.2), for 50 min at 37°C, and by the buffer only, under the same conditions.

Electron microscopy

Thin blood smears were submitted to hemolysis after drying for 4-6 h under environmental conditions, in a 0.80% NaCl solution containing 2.5% $^{V}/v$ concentrated formalin [3], or a 2.5% $^{V}/v$ aqueous glutaraldehyde solution [8], followed by phosphotungstic acid staining, and several washings in distilled water [3]. Some hemolysed smears were then covered by a thin palladium film at a 15.°-20.° shadow-casting angle.

For thin sectioning, fixation of the blood was performed as follows [1]: to 15 drops of blood, 15 drops of 2% glutaraldehyde in 0.20M Millonig's buffer [15] were added, drop by drop, each of which followed by slow agitation; after 30 min, the suspension was diluted with 2-3 volumes of 1% glutaraldehyde in the buffer, and fixed for 2 h. Erythrocytes were washed three times in the buffer, and fixed for 20 min in 1% osmium tetroxide in the same buffer. After staining in an 1% aqueous uranyl acetate solution for 30 min, erythrocytes were dehydrated in the alcohol series, and embedded in Polylite 8001-P [7]. Thin sectioning was done in MT-1 and MT-2 Porter-Blum microtomes; the sections were stained by lead citrate [16].

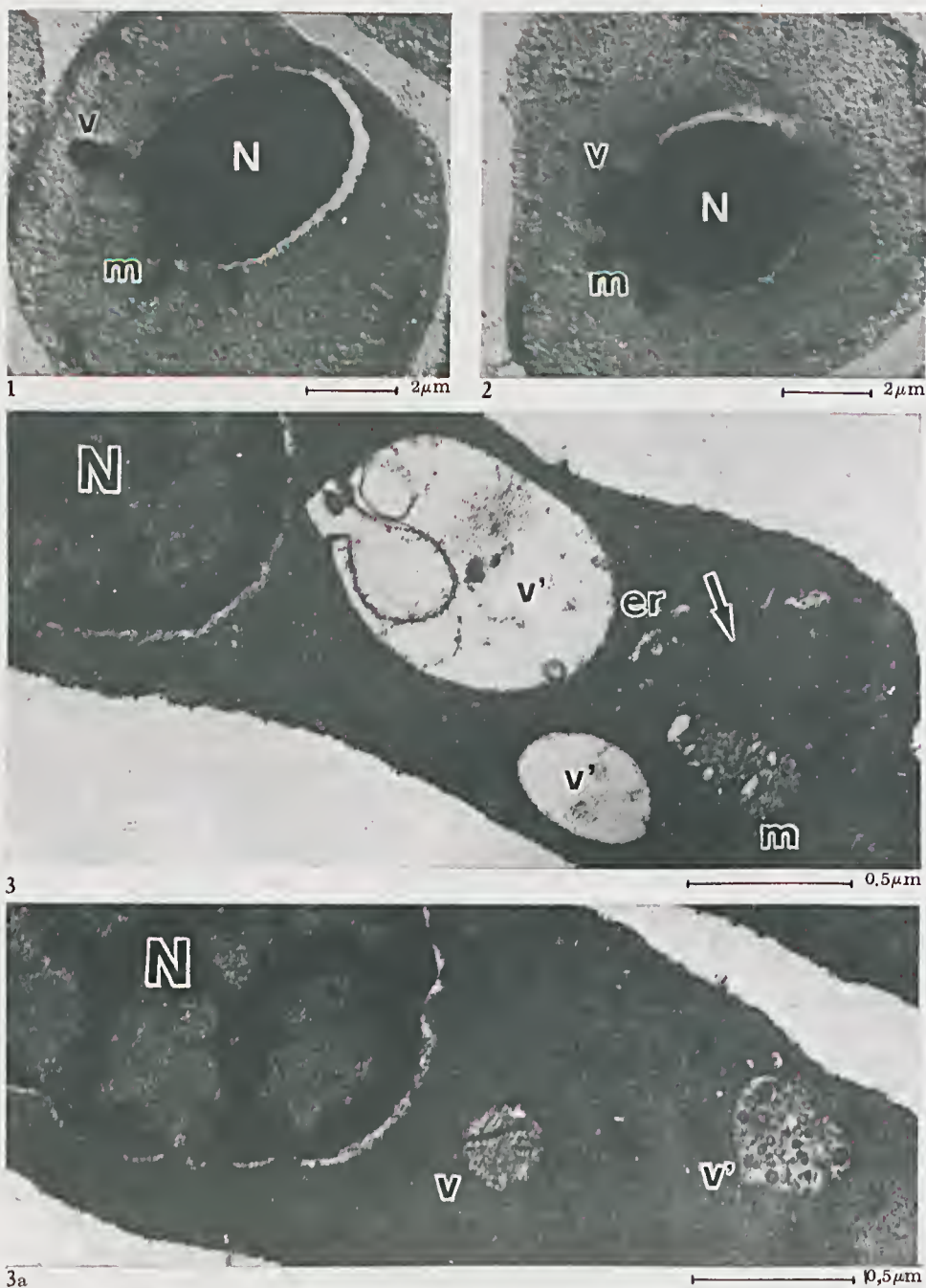
All preparations were examined in the ÜM 100b and Elmiskop I electron microscopes, at 60 Kv, from 2,500 to 20,000 magnification.

RESULTS

Blood smears stained according to the Rosenfeld technique showed 2.5% to 3.0% of immature erythrocytes, as well as absence of parasites in the peripheral blood. Almost the same proportion of immature erythrocytes was found in blood supravitally stained with brilliant cresyl blue, in which these red cells are characterized by a variable amount of basophilic reticulum. A high number of mature erythrocytes presented from one to four basophilic granules individually disposed at several cytoplasmic sites. Positive results for the Feulgen reaction, were hardly visible in the cytoplasm. A good visualization of positive results was possible in the vicinity of the nuclei. However, they could be mistaken for nuclear protrusions. Erythrocytes of blood smears submitted to partial drying, and then hemolysed, show an ellyptical stroma containing a central nucleus, granular and rod-shaped forms with variations in diameter and length of about 0.40 μ or 0.25 — 0.60 μ x 1.20 — 1.50 μ, respectively; in general, the granules are more electron-dense than the rod-shaped forms (Figs. 1, 2). Thin section of mature carp erythrocytes, commonly contain different kinds of vesicles, mitochondria in various degenerative stages, and moderately dense amorph masses, more or less compact and agglomerated, concomitantly present in the cytoplasm, associated to the endoplasmic reticulum, and in the nucleoplasm (Figs. 3, 4, 8, 9); an amorph mass can be seen in the nuclear membrane pore, between cytoplasm and nucleoplasm (Fig. 5).

Mitochondria and erythrocyte nuclei are frequently connected by an apposition of the external mitochondrial and nuclear membranes (Fig. 4), or through the passage of dense chromatinic material into the organelles (Figs. 5, 6). Such connections occurs always at nuclear region where chromatinic material is juxtaposed to the nucleolema, at sites of variable distances from the nuclear pores, through which hemoglobinized cytoplasm enters the nucleoplasm (Figs. 3, 4, 8, 9, 11). Convoluted chromatinic threads, invade mitochondria still presenting their chracteristic structure (Figs. 5, 6), or organelles which already had suffered a modification (Fig. 8). Mitochondria that had received chromatin, modify and detach themselves from the nucleus giving rise to free vesicles (Fig. 9) containing dense, fibrous, as well as granulated material.

Free vesicles containing myelin-like figures are constantly present in erythrocytes. They seem to originate from the external nuclear membrane, as suggested in figures 10 and 11; some vesicles presenting myelin-like figures originate from degenerated mitochondria which had not received chromatinic material (Fig. 7). Vesicles apparently of other types, contain mainly small vesicles or besides these small round elements, a fine fibrous material (Fig. 3a); several vesicles contain only a few membrane traces or nothing at all (Figs. 3,9). Vesicles carrying granular, fibrous, dense, amorphous materials, and myelin-like figures or traces of membrane, were found approaching the invaginated plasmic membrane (Figs. 12, 13). These vesicles may be simple, or may agglomerate, fusing among themselves.

BRUNNER J., A., COIRO, J.R.R., MITSUTANI, C.Y., CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. & MENEZES, H. Ultrastructural aspects of mature *Cyprinus carpio* erythrocytes. *Mem. Inst. Butantan, 39*: 157-168, 1975.

MATURE CARP ERYTHROCYTES

Figs. 1 and 2 - Cells from hemolysed blood smears. (N) nuclei; (m) mitochondria; (V) large vesicles.

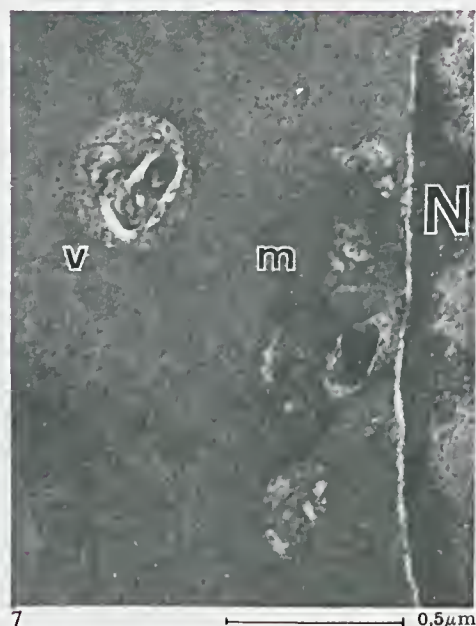
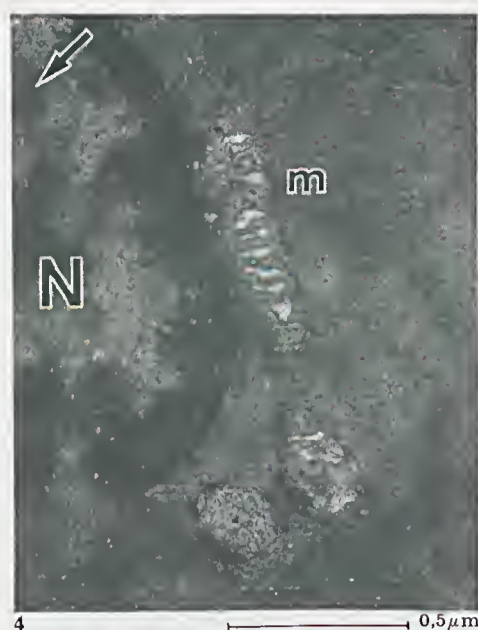
Figs. 3 and 3a - Thin section of the same cell. (N) nucleus; (m) degenerated mitochondrion: (er) endoplasmic reticulum; (arrow) amorph material; (V) vesicle of mitochondrial origin; (V') vesicles of unknown origin.

THIN SECTIONS OF MATURE CARP ERYTHROCYTES

Fig. 4 - (N) nucleus; (m) mitochondrion juxtaposed at the nuclear membrane; (arrow) amorph material.

Fig. 5 - (N) nucleus; (m) mitochondrion receiving chromatinic material; (arrow) amorph material in the nuclear membrane pore.

Fig. 6 - (N) nucleus; (arrow) passage of condensed chromatin into a partially modified mitochondrion (m).

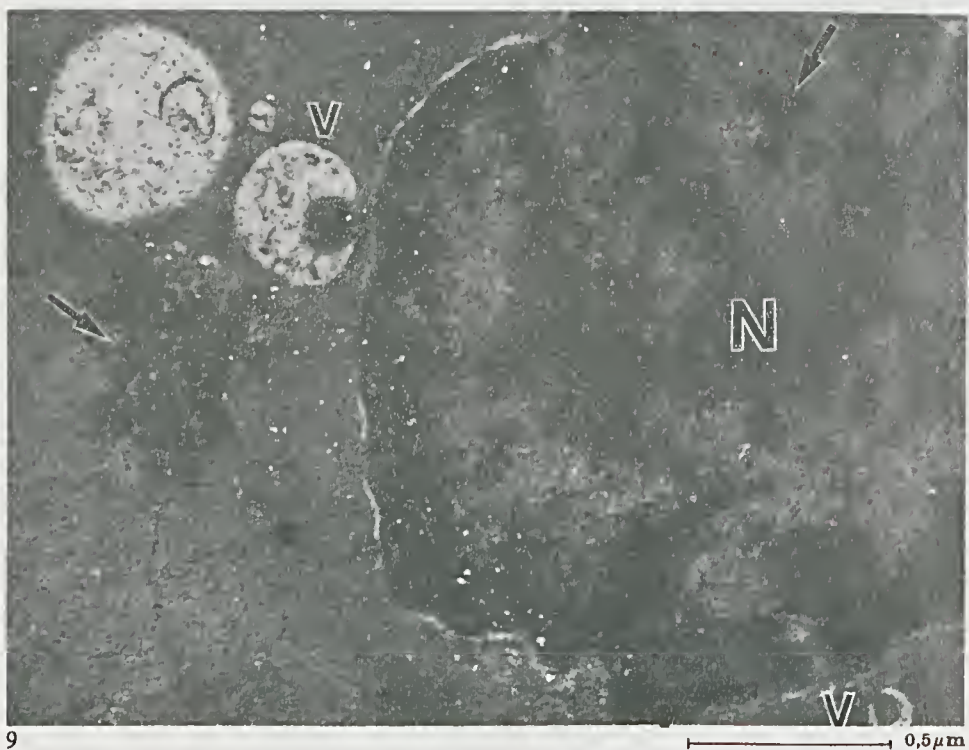
Fig. 7 - (N) nucleus; (m) partially modified mitochondrion containing dense material; (V) vesicle, possibly of mitochondrial origin, containing myelin figures.

THIN SECTIONS OF MATURE CARP ERYTHROCYTES

Fig. 8 - (N) nucleus; (arrow) amorph mass; (p) - nuclear membrane pore; (V) a recently constituted vesicle; nearly detached from the nucleus, showing condensed chromatinic material.

Fig. 9 - (N) nucleus; (arrows) amorph masses in cytoplasm and nucleoplasm; (V) vesicle containing dense material, recently detached from the nucleus.

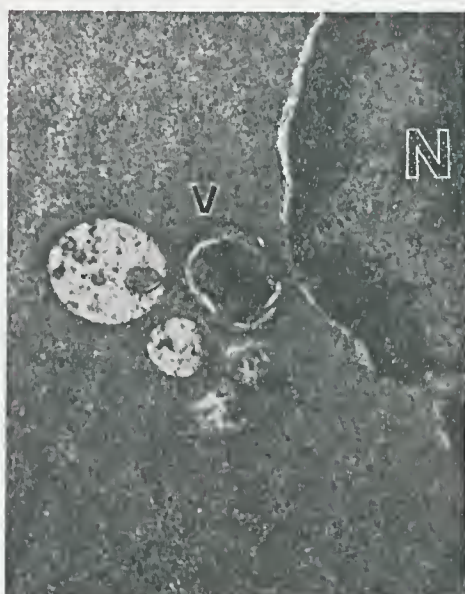
BRUNNER J., A., COIRO, J.R.R., MITSUTANI, C.Y., CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. & MENEZES, H. Ultrastructural aspects of mature *Cyprinus carpio* erythrocytes. *Mem. Inst. Butantan, 39*: 157-168, 1975.

THIN SECTIONS OF MATURE CARP ERYTHROCYTES

Fig. 10 - (N) nucleus showing invagination. A convoluted membrane within the increased perinuclear space can be observed (arrow).

Fig. 11 - (N) nucleus; (V) vesicle conataining a myelin-like figure, almost detached from the nucleus.

Fig. 12 - (V) vesicles fusing among themselves, approaching the plasmic membrane at an invaginated region (arrow).

Several sections of mature erythrocytes show relatively thin marginal bands ranging from 140 to 250 mμ in diameter. They are frequently detected in longitudinal sections (Fig. 14), and occasionally in cross sections (Fig. 15), where fifteen to eighteen microtubules of 18 to 21 mμ in diameter can be seen.

DISCUSSION

The absence of parasitism in the peripheral blood of *Cyprinus carpio* specimens, as confirmed through the Rosenfeld staining [17], allows secure interpretations on hemolysed, as well as on sectioned erythrocytes. In the former instance (Figs. 1, 2), the rod-shaped forms, generally disposed around the nucleus, can be taken as mitochondria, according to earlier demonstrations on immature mammalian erythrocytes [4,20]. This interpretation is also supported by thin sectioned erythrocytes, where mitochondria are observed in the same dispositions (Figs. 4, 6, 7, 11). The granular forms, more electron-dense than the rod-shaped ones (Fig. 2) present themselves in the same disposition, and possibly correspond to the vesicles carrying nuclear material (Figs. 8, 9). Their higher density may be due to the condensed chromatinic content. Hemolysis of red blood cells in partially dried smears, permits a global visualization of their organelle constitution, as well as on the disposition of such elements.

The outstanding phenomenon is the formation of vesicles carrying chromatinic material. They originate from mitochondria, an event which seems to be general for mature chicken [6], bothrops snake [14], frog [5] and carp [2] erythrocytes. Feulgen reaction, done on erythrocytes from specimens of all those vertebrates, was always positive· although these results were not conclusive. However, mature frog erythrocytes showed labelled vesicles when ^{3}H-thymidine was given to animals, previously turned anemic through phenylhydrazine in order to activate erythropoiesis, and thus enhancing the incorporation of this DNA basis [13]. Obviously chromatin labelling persists until the last erythrocytic maturation stage where the phenomenon of vesicle formation takes place. This occurrence was never detected in immature forms through Feulgen reaction or electron microscopy.

Formation of vesicles begins by mitochondria juxtaposition on the nuclear membrane at regions where chromatin is disposed (Fig. 4); hence, this occurs at points more or less distant from the nuclear pores through which hemoglobinized cytoplasm enters the nucleoplasm (Figs. 3, 4, 8, 11). While condensed chromatin penetrates into the mitochondrion, a disorganization of its inner lamellar structure gradually occurs (Fig. 6). After cessation of chromatin penetration, mitochondria may still present vestiges of their structure (Fig. 7) or lose it completely, as shows in figures 8 and 9. These modified organelles displace themselves through the cytoplasm, approaching the plasmic membrane. At this region the membrane invaginates (Figs. 12, 13), suggesting a possible occurrence of a phenomenon of exocytosis, like that which may occurs in final maturation stages of mammalian reticulocytes [11,18]. When inner mitochondrial membranes disappear, organelle diameters increase gradually from about 0.14 (Fig. 4) to 0.40 μ (Fig. 8); vesicles in the proximity of the plasmic membrane reach diameters ranging from 0.60 (Fig. 12.) to 0.70 μ (Fig. 13).

THIN SECTIONS OF MATURE CARP ERYTHROCYTES

Fig. 13 - (V) vesicles near the plasmic membrane, one of which already contacting the invaginated plasmic membrane; (arrow) amorph mass partially surrounded by the smooth endoplasmic reticulum.

Fig. 14 - Longitudinally sectioned microtubules, constituting the marginal band (arrows).

Fig. 15 - Transversally sectioned microtubules (arrow).

It would be of interest to verify whether vesicles still contain active DNA or only products from the DNA degradation. On the other hand, the possibility of a correlation between this phenomenon and the nuclear extrusion in mammal orthochromatic erythroblasts, shoud be considered.

Several vesicles commonly found in erythrocytes are of different origin. In figures 3 and 3a it is difficult to ascertain the origin of vesicles of low density and of the one containing small vesicles among granular and fibrous material. The degenerated mitochondrion of figure 3, distant from the nucleus, continuing the degenerative process, could originate the moderately dense vesicle of figure 3a. Mitochondria may also degenerate (Fig. 7) through modifications occurring in their inner lamellar structure, from which myelin figures rise.

A region of the nucleus may invaginate, accompanied by a convolution-like process of the inner nuclear membrane, and an increase of the perinuclear space at this region (Fig. 10). Afterwards the whole set protrudes, giving rise to a vesicle limited by the external nuclear membrane whose content is a myelin-like figure originating from the inner membrane (Fig. 11). This may be related with the nuclear volume reduction possibly occurring even in the last stage of erythrocytary maturation. No such phenomenon was detected in erythrocytes of specimens of other groups.

Erythrocyte nucleoplasm and cytoplasm frequently contain some amorphous material presenting an intermediary density between chromatin and both plasmas (Figs. 3, 8, 9, 13). These masses, generally associated to the smoth endoplasmic reticulum (Figs. 3,13), were never found in erythrocytes of other groups. Their nature and origin are unknown, but the presence of such a mass in the nuclear membrane pore (Fig. 5), and its position sometimes distant from the nucleus (Figs. 3, 13) may, although remotely, suggest a nuclear origin.

The marginal bands of carp erythrocytes are thin, compared to that found in erythrocytes of other groups [6,9,10,14,19,21], specially as regards the diameter, about 700mμ of the chelonian erythrocyte band [8]. Correspondingly the number of microtubules is also lower, although the possibility that degenerative bands of old erythrocytes had been observed, can not be excluded.

Acknowledgements: The authors wish to tank Mrs. Vera Mondin Weisz, Mr. Alípio Silva Gonzales, Mr. Carlos Alberto Gonçalves Silva and Mr. Heitor Costa for their excellent technical assistance, and Mrs. Sibylle Heller for her editorial aid and translation.

RESUMO: Eritrócitos maturos de *Cyprinus carpio* mostram um fenômeno de formação de vesícula Feulgen positiva, originária de um mitocôndrio justaposto à membrana nuclear. Enquanto a cromatina condensada penetra no mitocôndrio, o organelo sofre modificações na estrutura lamelar, dando origem a uma vesícula que se destaca do núcleo e se desloca através do citoplasma. Alguns aspectos sugerem que o conteúdo da vesícula é eliminado do eritrócito. Este mecanismo parece ser geral para os eritrócitos maturos nucleados de outros vertebrados. Outras vesículas de origem desconhecida, algumas originadas de mito-

côndrios degenerados e outras da membrana nuclear, foram observadas.

Um material denso e amorfo, nunca encontrado em eritrócitos de outros vertebrados, estava frequentemente presente no nucleoplasma e no citoplasma, associado ao retículo endoplasmático liso. Bandas marginais, de menor diâmetro que as de eritrócitos de outros grupos, foram observadas.

UNITERMO: Ultra-estrutura de eritrócitos de *Cyprinus carpio*.

REFERENCES

1. BRUNNER JR., A. & COIRO, J.R.R. Fixation of erythrocytes in a glutaraldehyde gradient, followed by osmium tetroxide. *An. Acad. bras. Ciên., 45:* 678-679, 1973.

2. BRUNNER JR., A., COIRO, J.R.R., MENEZES, H., MITSUTANI, C.Y. & CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. Vesicles carrying nuclear material in mature *Cyprinus carpio* erythrocytes. *Experientia* (Basel), *31:* 531-532, 1975.

3. BRUNNER JR., A. & VALLEJO-FREIRE, A. Electron microscopic observations on granules and filaments (Reticulosomes) of reticulocytes. *Exp. Cell Res., 10:* 55-62, 1956.

4. BRUNNER JR., A., VALLEJO-FREIRE, A. & SOUZA SANTOS, P. Electron microscopy of thin sections of reticulocytes. *Experientia* (Basel), *12:* 255, 1956.

5. CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. Unpublished observations, 1973.

6. COIRO, J.R.R. Ultrastructural comparative study on elements of avian and mammalian erythrocytary series. Correlation with hemoglobin biosynthesis. Thesis (condensation), Univ. S. Paulo, 1975. *Mem. Inst. Butantan* (in press).

7. COIRO, J.R.R. & BRUNNER JR., A. Behaviour of Polylite 8001 with plasticizing additives. *An. Acad. bras. Ciên., 45:* 679-680, 1973.

8. COIRO, J.R.R., BRUNNER JR., A. & MITSUTANI, C.Y. A simple method for the observation on the marginal band in avian and chelonian erythrocytes (submitted to appreciation).

9. DAVIES, H.G. Structure in nucleated erythrocytes. *J. Biophys. and Biochem. Cytol., 9:* 671-687, 1961.

10. FAWCETT, D.W. & WITEBSKY, F. Observations on the ultrastructure of nucleated erythrocytes and thrombocytes, with particular reference to the structural basis of their discoidal shape. *Z. Zellforsch., 62:* 782-806, 1964.

11. GASKO, O. & DANON, D. Deterioration and disappearance of mitochondria during reticulocyte maturation. *Exp. Cell Res., 75:* 159-169, 1972.

12. LISON, L. Histochimie et Cytochimie Animales. Principes et méthodes. Paris, Gauthier-Villars, 1953. I, p. 475-480.

13. MENEZES, H., BRUNNER JR., A. & MITSUTANI, C.Y. Unpublished results, 1974.

14. MENEZES, H., MITSUTANI, C.Y., COIRO, J.R.R., CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. & BRUNNER JR., A. Ultrastructure of mature erythrocytes from five bothropic species. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 51-62, 1974.

15. MILLONG, G. Advantages of a phophate buffer for OsO_4 solutions in fixation. *J. Appl. Phys., 32* (8): 1637, 1961.

16. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol., 17:* 209, 1963.

17. ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan, 20:* 329-334, 1947.

18. SIMPSON, C.F. & KLING, J.M. The mechanism of mitochondrial extrusion from phenylhidrazine-induced reticulocytes in the circulating blood. *J. Cell Biol., 36:* 103-109, 1968.

19. TOOZE, J. & DAVIES, H.G. Cytolysomes in amphibian erythrocytes. *J. Cell Biol., 21:* 146-150, 1965.

20. VALLEJO-FREIRE, A. & BRUNNER JR., A. Eritrócitos na reticulocitose do saturnismo experimental. *Mem. Inst. Butantan, 28:* 245-266, 1958.

21. VANKIN, G.L., BRANDT, E.M. & DeWITT, W. Ultrastructural studies of red blood cells from thyroxin-treated *Rana catesbeiana* tadpoles. *J. Cell Biol., 47:* 767-772, 1970.

Recebido para publicação em 11-IV-1975 e aceito em 28-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 169-206, 1975

COMPARATIVE STUDY ON THE ULTRASTRUCTURE OF THE ELEMENTS OF THE AVIAN AND MAMMALIAN ERYTHROCYTIC SERIES. CORRELATION WITH HEMOGLOBIN BIOSYNTHESIS. *

JOSÉ RAFAEL R. COIRO
Laboratory of Electron Microscopy, Instituto Butantan

ABSTRACT: Ultrastructural studies of the erythron of birds and mammals were made in smears of stromata and in ultrathin sections of erythrocytes from the peripheral blood of normal and anemic animals.

Polyacrylamide gel electrophoresis and spectrophotometry were also used to detect intrahemosomal hemoglobin and the presence of heme group in the supernatants of fraction lysates. Chromatin extrusion in mature avian erythrocytes was correlated to nuclear extrusion in mammal orthochromatic erythroblasts. Furthermore, the nature of "Substantia Granulo-Filamentosa" (Sgf) was studied in birds and mammals, as well the degree of cell maturation as reaveled by polysome countings per μ^2. The marginal band has been investigated in ultrathin sections and smears of hemolysed blood.

Results may be summarized as follows:

1. In smears of hemolysed blood, filaments of larger diameter representing Sgf may be identified as mitochondria, whereas those of smaller diameter are interpreted as hemosomes.
2. In bleeding anemias, Sgf is almost exclusively made out of mitochondria.
3. The genesis of hemosomes is the same in birds and mammals and is related to hemoglobin biosynthesis.
4. No connection exists between intranuclear hemoglobin and synthesis blockade. This is related to chromatinic extrusion concomitant to polysomic dissociation.
5. In bleeding anemias avian and mammalian responses of the hemopoietic tissue differ in reaction time.

---

* Condensed from a Doctorate's Thesis presented to the Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Brasil. Supported by grant. n.º 11.218/74 from the Conselho Nacional de Pesquisas.
Address: Caixa Postal 65 — São Paulo — Brasil.

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

UNITERMS: Ultrastructure of avian and mammalian erythrocytes. Hemoblobin biosynthesis.

INTRODUCTION

Through microspectrophotometry it has been demonstrated that during erythrocyte maturation basophilia decreases as hemoglobin concentration increases (Thorell [93], 1950). In basophilic erythroblasts a decrease of ribonucleoprotein is noted, as well as the disappearance of the nucleolus. The Golgi complex, other structures, and organelles (Orlic et al. [69], 1965; Simpson & Kling [91], 1967) have been observed.

The polychromatophilic erythroblast is characterized by a decrease in the number of mitochondria; hemoglobin synthesis is initiated, conferring a higher cytophasmic density in relation to the basophilic erythroblast.

In orthochromatic erythroblasts the membrane pores tend to disappear, and chromatin undergoes condensation. Still in this phase the nucleus is extruded, and less frequently suffers karyolysis or karyorrhexis according to the observations of Astaldi et al. [1] (1950) and Leonardi [59] (1951). After the extrusion, the reticulocyte phase follows, showing an intense hemoglobin synthesis in the peripheric blood (Seno [87], 1958; Fantoni et al. [41], 1968; Brunner [14], 1968), which results in the appearance of the mature erythrocyte.

The first observations of microtubules in lower vertebrate erythrocytes were made by Ranvier [80] (1875), Dehler [35] (1895) and Nicholas [67] (1896). Meves [65] (1903) observed these structures in avian erytrocytes by supravital staining, and suggested that the microtubules, composing the marginal band, confer to them their chracteristic biconvex shape. Weidenreich [97] (1905) considered the band as an artifact due to the staining technique. Fawcett [42] (1959) however, was able to ascertain by electron microscopy the actual existence of the marginal band in erythrocytes of the toadfish (*Opsanus tau*). Fawcett & Witebsky [43] (1964) described the band as formed by 25 parallel tubules of about 200 Å each, and state that this band is responsible for the elliptical shape of lower vertebrate erythrocytes. They proposed the term "endoplasmic ring" for this structure of both erythrocytes and thrombocytes of the toadfish. Grasso [46] (1966) supposed that the function of the band is closely related to the shape and elasticity of mammalian erythrocytic cells.

Endocytosis is the generic term given to any type of incorporation of substances into the cell (Bessis [6], 1972). Lewis [60] (1931) observed the incorporation of droplets, 1-5 μ in diameter, calling this mechanism pinocytosis. Endocytosis of dense substances such as ferritin has been analysed by Bessis & Breton-Gorius [7] (1956) and Bessis [5] (1958). Parks & Chiquoine [70] (1957) observed this mechanism for silver compounds.

Ribonucleoproteins are constituted of about 50% RNA, and 50% proteins (Dintzis et al. [38], 1958). Warner et al. [96] (1962), found in reticulocytes that ribonucleoproteins can present themselves from monosomic to polysomic forms. The arrangement most frequently found is the pentamerous one whose monosomes are united by a thin filamentous m-RNA bridge. Mathias et al. [63] (1964) demonstrated that this bridge of ribonucleic nature is sensitive to RNase. Glowacki & Millette [45] (1965) believed that in the course of maturation a

total disaggregation of pentamerous polysomal forms directly to monomerous forms would occur, contrary to Marks et al.[62] (1963) and Rifkind et al.[83] (1964) who affirm that this disaggregation is gradual, i.e., pentamerous, tetramerous, trimerous, dimerous, and momomerous. Burka & Marks[24] (1967), maintain that the last RNA to disappear is the t-RNA, although no more globin synthesis occurs in the already nearly mature reticulocyte. The polysomic activity during the protein synthesis is higher in the polychromatophil and the orthochromatic erythroblasts (Rifkind et al.[83], 1964), as well as in the less mature reticulocytes (Glowacky & Millette[45], 1965). Based on the theory of Jacob & Monod[51] (1961) as to the relationship between nucleus and cytoplasm it is possible to assume that the m-RNA and t-RNA are synthesised still in the erythroblastic phase, since reticulocytes do not contain any more DNA. There is evidence that biosynthesis of the r-RNA precursors occurs within the nucleolus (Brown & Gurdon[12], 1964; Penman et al.[72], 1966; Edströn & Daneholt[40], 1967; Izawa & Kawashima[50], 1968). Seno et al.[88] (1963) and Pinheiro et al.[75] (1963) demonstrated the absence of DNA synthesis both in reticulocytes and the different RNA types.

Brunner & Vallejo-Freire[22] (1964) found convoluted forms in reticulocytes, similar to myelin figures, which can be observed in a great variety of cells, such as mature erythrocytes about to lyse (Policard et al.[76], 1957), branchial epithelium of salamander (Schultz & De Paola[86], 1958), cultured cells of guinea-pig testicles infected with viruses and rickettsiae (Brunner, 1961 — personal communication), mitochondria of leucocytes within the epithelium of patients with American tegumentary leishmaniosis (Coiro et al., 1973 — umpublished observations), and mitochondria of pancreatic cells of normal adult rats (Coiro & Souza Dias, 1973 — umpublished observations).

Since the work of Cesaris-Demel[26] (1907) up to present, the pre-existence of organelles in reticulocytes has been discussed although the work of Simmel[90] (1926), Seyfart[89] (1927), Sano[85] (1955) and Brecher[11] (1958), allowed cleary the observation of the "Substantia granulo-filamentosa" ("Sgf"). Even so, other authors considered the "Sgf" as an artifact resulting through the applied staining technique, due to ribonucleoprotein precipitation caused by supravital dyes such as brilliant cresyl blue and Janus green B (Dustin[39], 1947; Thorell[93], 1950; Burt et al.[25], 1951; Bessis[4], 1954; Thoma[92], 1959).

Bernhard et al.[2] (1949) observed under the electron microscope reticulocytes after osmotic hemolysis. This procedure allowed the observation of circular membranous intrareticulocytary forms whose nature also was much discussed by various authors as Braunsteiner & Bernhard[9] (1950), Bessis[3] (1950), Peters & Wigand[74] (1950), Wolpers[100] (1956), Brunner & Vallejo-Freire[21] (1956), Jung[54] (1959) and Hug et al.[49] (1959). Brunner & Vallejo-Freire[21] (1956) however, found filamentous forms, granules, and fine filaments in hemolysed reticulocytes after partial drying. At this same period of time, Braunsteiner et al.[10] (1956), and Brunner et al.[23] (1956) confirmed the presence of mitochondria in those cells. Later, Brunner[13] (1962) clearly demonstrated the mitochondrial and ribosomic nature of the "Sgf" in association with the dye. Granules and fine filaments were interpreted as ribosomes and smooth endoplasmic reticulum (ER) respectively.

Reimann[81] (1942) working with chicken proerythrocytes concluded that

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

the hemoglobin biosynthesis is not related to the nucleus but to the "Sgf". Jensen et al. [52] (1953) verified that hemoglobin biosynthesis is related to the amount of "Sgf". Brunner & Mombrum [19] (1972) demonstrated in mammalian reticulocytes the presence of organelles, which, on account of their ultrastructural similarity with mitochondria, were denominated mitochondrion-like organelles (MLO). Brunner et al. [20] (1972) suggested that the final hemoglobin biosynthesis occurs in the MLO or hemosomes.

The purpose of the present work is to analyse comparatively the ultrastructural aspects os the avian and mammalian erythron, and to elucidate several points in relation to morphology and physiology. Accordingly, we planned a study on the following: a) origin and nature of the cytoplasmic vesicles present in avian erythrocytes; b) ultrastructural identity of avian and mammalian "Substantia granulo-filamentosa"; c) genesis of the mitochondrion-like organeles; d) hemoglobin presence in MLO from birds; e) estimation of the cell maturity degree in the avian erythron.

MATERIAL AND METHODS

Material

Avian blood

Adult chickens (*Gallus gallus*), 2.5 — 3.0 kg. Blood was harvested from the marginal wing vein or by cardiac puncture.

Embryos, 14-18 days old, and newborn chicks. Blood was harvested by cardiac puncture.

Adult chickens with anemia induced by bleedings, withdrawing daily 30-40 ml of blood during 2-3 days. One to two days after the last cardiac puncture, blood was harvested.

Adult chickens with anemia induced by phenylhydrazine in an 1% aqueous solution in a 1 ml/kg ratio, by subcutaneous injections per 4 days. Five days after the last dosis the blood was harvested.

Mammalian blood

Adult guinea-pigs (*Cavia porcellus*), weighing 250-300 g, with phenylhydrazine-induced anemia injected in an 1% aqueous solution in a 1 ml/kg ratio, during 3 successive days. Three days after the last dosis, blood was withdrawn.

Adult guinea-pigs (*Cavia porcellus*) 250-300 g each, with anemia induced by successive bleedings by cardiac puncture, withdrawing 5 ml during 5 successive days. Three days after the last puncture, blood was harvested.

Rabbit embryos (*Oryctolagus cuniculus*), 16-20 days old. Blood was harvested after sectioning the umbilical cord.

Human blood

Blood from a patient with acquired hemolytic anemia was harvested by venous puncture.

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

Methods

Rosenfeld [84] staining (1947, modified)

The modification consisted in the dilution of the dye in a 1:4 ratio on the slide, with degasified distilled water, leaving the diluted dye in contact with the smear for 2 h.

Supravital staining with brilliant cresyl blue

One gram dye was dissolved in 1 liter of a 0.85% (1:1000) saline solution. Cells were stained in a 1:9 ratio of blood drops and dye respectively.

Feulgen reaction (Lison [61], 1953, modified)

The original indications of Feulgen-Rosembeck (1924) were followed except for the fixation of the smears, which was carried out in methanol for 3 min.

Hemolysis. Technique A — According to Brunner & Vallejo-Freire [21] (1956). Technique B — Followed the procedure of technique A, but with a modified fixing process introduced for mature erythrocytes. Instead of formol, 25% glutaraldehyde in 90 ml NaCl at 0.80% in an amount of 10 ml was used mainly in order to improve the degree of preservation of stroma structures, as for instance the marginal band, and organelles (Coiro et al., 1973 — unpublished observations). Technique C — The same as A, however, modified as to the partial drying. The drying lasted for 5 min at 40°C in order to obtain circular forms (Coiro & Brunner, 1972 — unpublished observations). Technique D — Hemolysis in suspension to obtain circular forms in mammalian blood (Brunner & Vallejo-Freire [21], 1956).

Fixation

Blood was harvested into an anticoagulant consisting of 0.75 ml of 2% EDTA, and 0.25 ml of 4% sodium bicarbonate in a 1 ml per 10 ml ratio.

Double fixation

Fixation in a glutaraldehyde gradient followed by osmium tetroxide in Millonig buffer (pH 7.3) (Brunner & Coiro [16], 1973).

Direct fixation in potassium permanganate followed by osmium tetroxide in veronal acetate buffer (pH 7.3).

Simple fixation

Direct fixation in 1% osmium tetroxide in Millonig buffer (pH 7.3) for 20 min.

Fixation in hypotonic medium for phosphotungstic acid (PTA) staining (Brunner & Mombrum [19], 1972).

For blood fixed in glutaraldehyde and osmium tetroxide, the staining was done in an aqueous 1% uranyl acetate solution (Kellenberger et al. [56], 1958) for 30-40 min.

Dehydration was carried out in the alcohol series at 30%, 50%, 70%,

95%, 100% with pure acetone in a 1:1 ratio, and finally in pure acetone, for 10 min each.

Pre-imbibition — Imbibition — Embedding

Pre-imbibition was carried out in a 1:1 Polylite 8001 (Coiro et al. [33]; Coiro & Brunner [28], 1972) and pure acetone mixture for 1-2 h.

Polylite 8001 mixtures

A — Polylite 8001 .... 10 ml (Coiro et al. [33], 1972)
Benzoyl peroxide .... 0,2 g

B — Polylite 8001 .... 9 ml (Coiro & Brunner [29], 1973)
Dibutylphtalate .... 1 ml
Benzoyl peroxide .... 0,2 g

C — Polylite 8001 .... 7 ml (Coiro [27], 1972)
Benzoyl peroxide .... 0,2 g
Polylite T 200 .... 3,0 ml

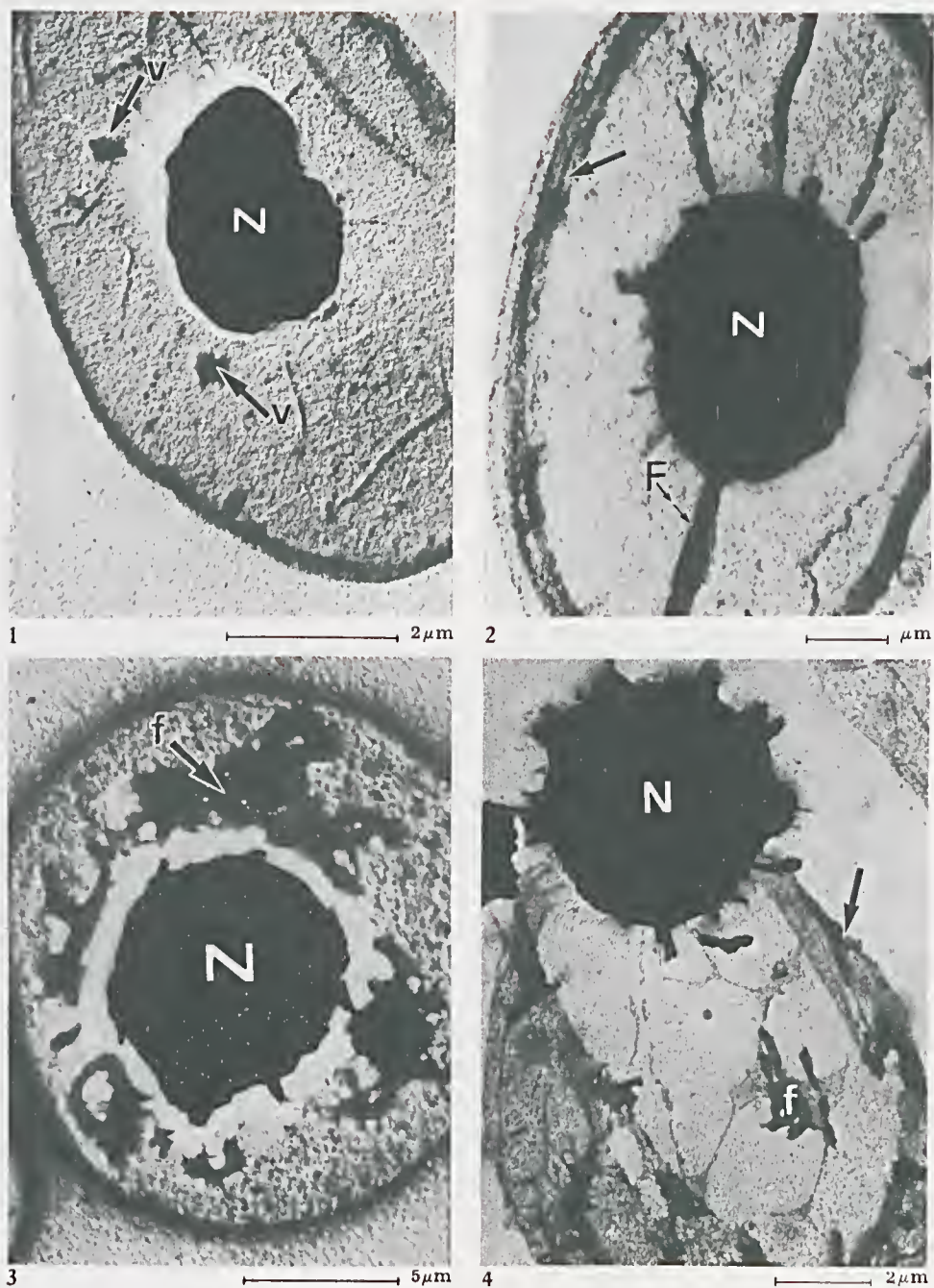
Imbibition of all material was carried out with Polylite 8001 or Polylite 8001-P (Polylite with a plastifyer) for 24 h in intermittent resuspension. Embedding was carried out in gelatin capsules, n.º 0 or n.º 00. Into all capsules, 5 drops of blood imbibed in polyester were placed, and made up with the polyester in use. The cells were then centrifuged at 550Xg for 30 min. Polymerization was achieved in an incubator at a constant temperature of 58ºC for 72-96 h.

Ultramicrotomy — final staining — electron microscopy

MT-1, and MT-2 (Porter Blum) ultramicrotomes were used with crystal or diamond knives. Ultrathin sections were stained by lead citrate (Reynolds [82], 1963), and washed in degasified distilled water. Electron microscopes Siemens UM 100b, Elmiskop I, and Zeiss EM-9S2 were used for the examinations. Accelerating potencies varied from 60 to 100 Kv.

Fractionation, organelle isolation, and hemoglobin determination in avian blood

Blood was harvested by cardiac puncture from 60 embryos, 16 days old. Immature erythrocytes were fractionated, and the mitochondrion-like organelles (MLO) were isolated, washed and lysed according to the following procedure: a) addition of 4 ml blood to 8 ml of a solution prepared according to Glowacki & Millette [45] (1965); b) centrifugation of the cell suspension at 200Xg (900 rpm R=21 cm) for 10 min; c) resuspension of the sediment in a 0.32 M sucrose solution, 10 times its volume, according to Weinbach [98] (1961); d) homogenization in a Potter-Elvehjem tube, in the cold at about 1,000 rpm with 10 movements; e) centrifugation of the homogenate at 1,350Xg (R=21 cm) for 10 min; f) centrifugation in the cold of the supernatant at 14,830Xg (15,000 rpm — Spinco L, rotor 40) for 10 min; g) three washings by resuspension of the pellet with 0.32M sucrose, and controlling of the fraction's purity degree by electron microscopy; h) harvesting the last washing supernatant to be used as

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

HEMOLYSED SMEARS

Figs. 1 and 2 - Mature avian erythrocytes: 1 - (N) nucleus; (V) vesicles. 2 - (N) nucleus; (F) fold; (arrow) microtubule bundle.

Fig. 3 - Immature avian erythrocytes: (N) nucleus; (f) filaments.

Fig. 4 - Orthochromatic mammal erythroblast: (N) nucleus in extrusion; (f) filaments (Sgf); (arrow) stroma.

control; i) osmotic lysis by resuspending the pellet in 3 ml degasified distilled water; j) centrifugation of the suspension at 20,000Xg for 10 min, and concentration in a vacuum chamber of the supernatants and control; k) determination of hemoglobin by electrophoresis.

Fractionation, organelle isolation and hemoglobin determination in mammalian blood

For mammalian blood, several modifications of the procedure were adapted. In item "f", 10,000Xg instead of 14,830Xg was used, and in item "g", 5 instead of 3 washings were carried out.

Electrophoresis in disc polyacrylamide gel, and spectrophotometry of the concentrated supernatants

The method of Dietz & Lubrano [37] (1967), was used for electrophoresis, and spectrophotometry was performed in accordance with the method of Kampen & Zijlstra [55] (1964).

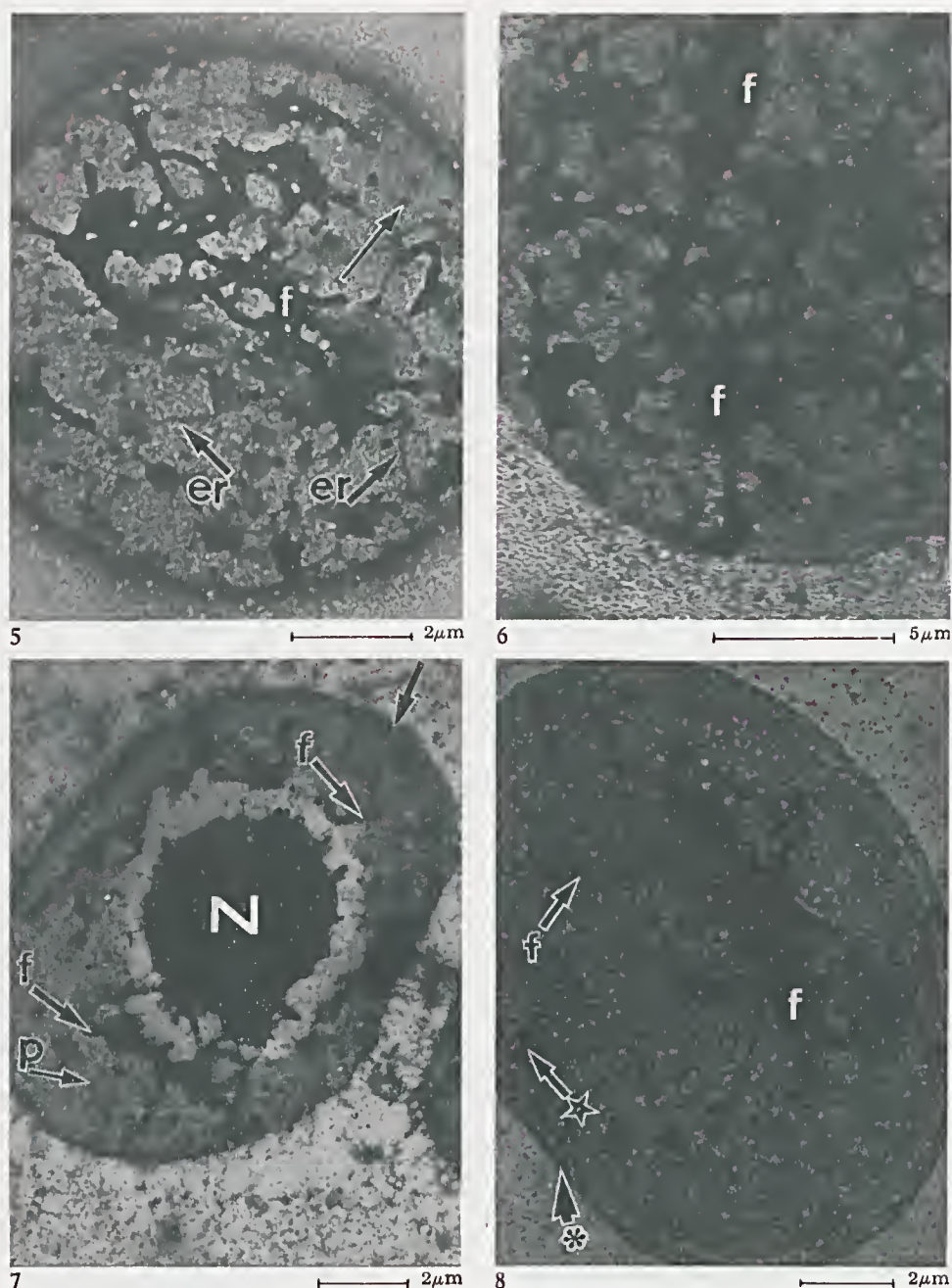
Estimation of the degree of erythrocyte maturation (Brunner & Coiro, 1973 — unpublished observations)

In mammals, the orthochromatic phase is easily recognized by the irregular cytoplasm configuration as well as by the eccentric disposition of the nucleus. Therefore, this phase has been selected as the point of reference for the polysome countings.

In birds, in the orthochromatic phase no evidence of irregular cytoplasmic configuration or perceptible nuclear eccentricity can be found. Therefore, an identification of the various maturation phases is very difficult. Basophilia of a cell, in a higher or lesser degree, depends on the amount of polysomes. Knowing the frequency of the polysomes, and their variations in the orthochromatic mammalian erythroblast ($x \pm y$), the determination of the polysome frequencies in immature avian cells allows a close estimate of their identity.

A value higher than $x + y$ would allow the identification of an avian erythroblast at least as polychromatophilic; a value between $x \pm y$, as orthochromatic, and less than $x - y$, as proerythrocyte, corresponding to the reticulocyte of mammals.

To attain these results, the following procedure was used:

1) Estimation of the negative magnification;
2) weighing of the photographic paper in order to estimate a determined area per gram;
3) weighing of the cytoplasm free of organelles, nucleus, and other structures for subsequent estimate of the cytoplasmic area;
4) conversion of the cytoplasmic area to μ^2;
5) counting of the polysome number in the whole cytoplasmic area, and estimate of the polysome number per μ^2.

HEMOLYSED SMEARS

Figs. 5 and 6 - Mammal embryo reticulocytes (Prohematia): 5 - (er) endopalsmic reticulum (arrow) polysome; (f) filaments. 6 - (f) a great number of filaments

Fig. 7 - Immature cell of avian embryo: (N) nucleus; (f) filaments; (p) polysome; (arrow) stroma.

Fig. 8 - Reticulocyte (Prohematia) from phenylhydrazine intoxicated adult mammal: (f) filaments; (asterisk) stroma; (star) segmented filament.

Calculation of the polysome number per μ^2 can be made according to the following formula:

$$Np/\mu^2 = \frac{Pp .\ A^2 .\ Np}{Pc .\ Ap}$$

Np/μ^2 = number of polysomes per μ^2;

Pp = weight of the known area of the photographic paper;

A^2 = increase of the photographic magnification, squared;

Np = polysome number in the cytoplasm free of other structures;

Pc = weight of the cytoplasm free of nucleus, organelles, and other structures;

Ap = known area of the photographic paper.

RESULTS

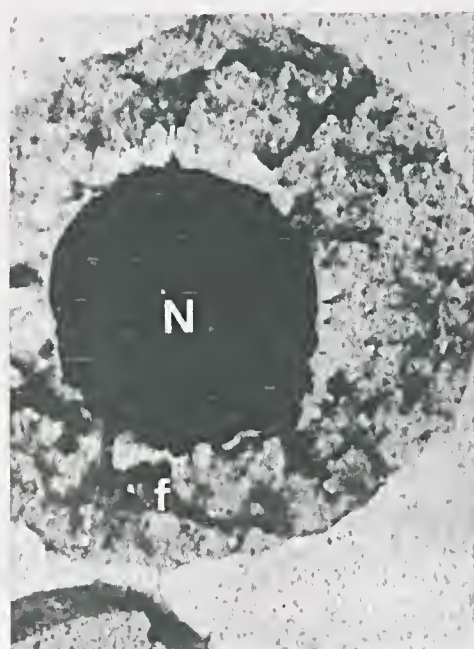
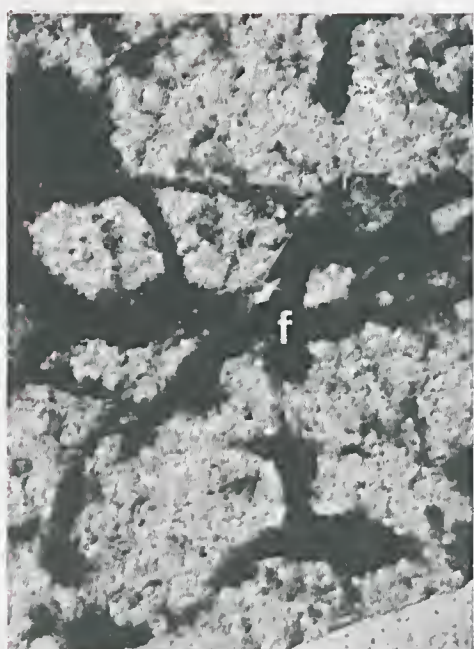
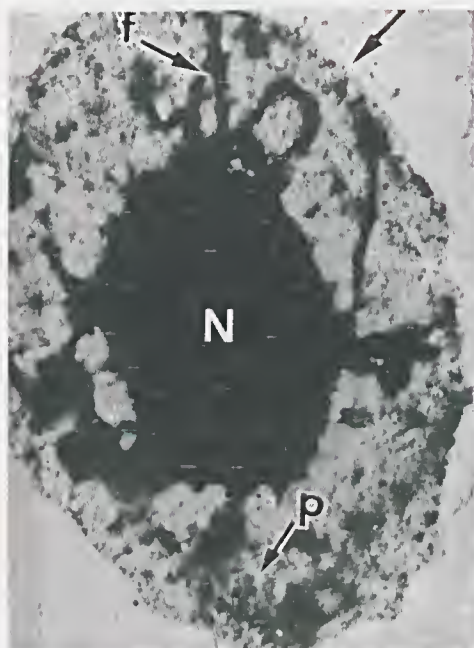
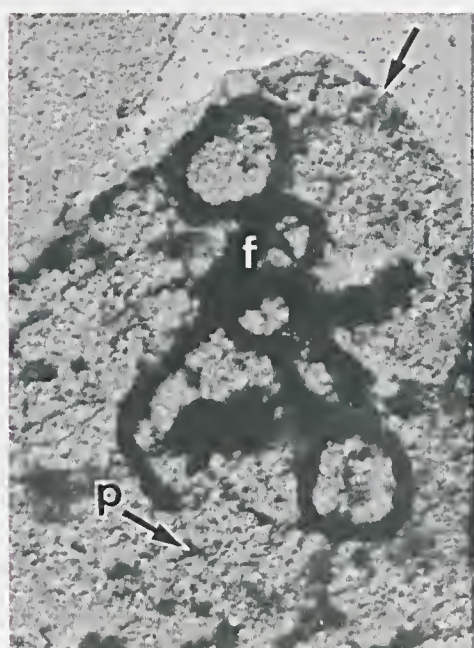
Rosenfeld [84] staining (1947 — modified)

In order to estimate the percentage of the different immature forms, this staining was used for the normal blood of chickens, embryos, as well as for the blood of animals with anemia induced by successive bleedings or phenylhydrazine intoxication.

Blood \ Immature forms	Basophilic erythroblast	Polychromatophil erythroblast	Orthochromatophil erythroblast
Embryos - 15 days	0,8%	11%	7%
Bleedings	1,4%	14%	6%
Phenylhydrazine	1,4%	18%	9%

Brilliant cresyl staining

Through this staining blood samples of normal animals and others with anemia of different types were examined. The immature forms are characterized by the presence of the "Substantia granulo-filamentosa".

Aves	Embryos	Phenylhydrazine	Bleedings	Normal adult
	100%	30%	30%	0,5%
Mammals	**Embryos**	**Phenylhydrazine**	**Bleedings**	**Human with acquired hemolytic anemia**
	100%	30%	30%	30%

HEMOLYSED SMEARS

Figs. 9 and 10 - Erythroblast and prohematia (reticulocyte) of a patient with acquired hemolytic anemia: 9 - (N) nucleus; (f) filaments. 10 - (f) filaments.

Figs. 11 and 12 - Immature erythrocyte and prohematia (reticulocyte) from bled adult chicken and mammals: 11 - (N) nucleus; (f) filaments; (p) polysome; (arrow) stroma. 12 - (f) filaments; (p) polysome; (arrow) stroma.

Feulgen reaction

The presence of Feulgen positive cytoplasmic vesicles, close to or distant from the nucleus has been verified. In DNase treated control smears, the cytoplasm did not present any Feulgen positive structures.

Hemolysis

Adult animal blood

In birds, most of the stromas are elliptical and with a dense central nucleus. Bodies with dimensions between 0.42 x 0.64 μ and 0.88 x 1.2 μ, apparently with the same nuclear density, can be observed at variable sites either distant from the nucleus or very close. The number of these bodies varies from 1 to 3 (Fig. 1). At the periphery of many stromas, filamentous formations can be seen of about 300 Å in diameter, parallel among themselves and to the periphery (Fig. 2). In mammals, the stromas are circular and with scarce dense granules.

Embryo blood

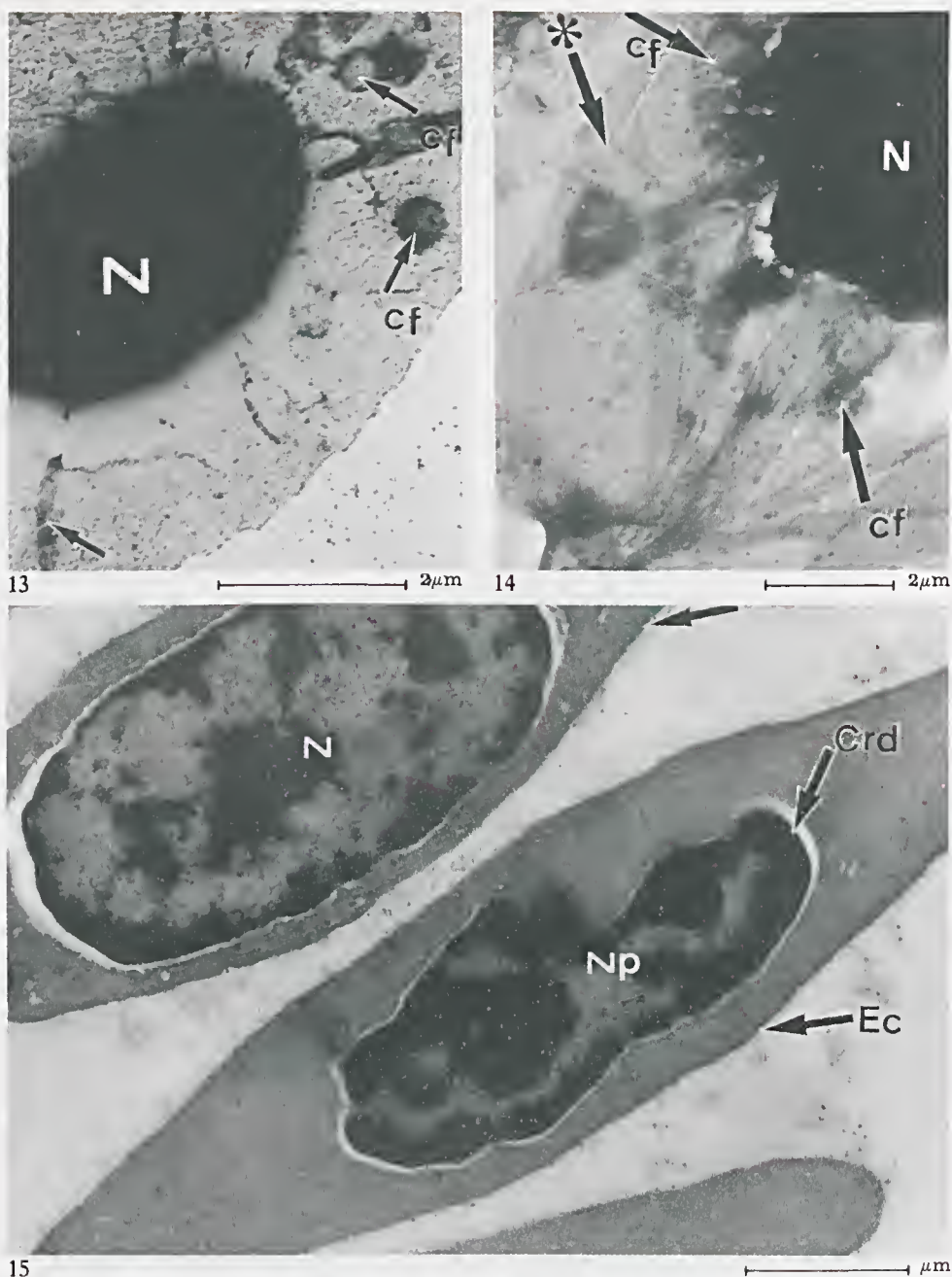
In the avian and mammalian stromas, dense filaments of variable configuration and disposition are observed; the mean diameter is 0.19 μ. Among the filaments, granules are seen with less density than that of the filaments and with a mean diameter of 0.20 μ. Dense filaments in mammals reach a mean diameter of 0.15 μ. Often it is possible to observe extremely thin filaments with a diameter of about 660 Å, whose extremities seem to be in contact with the stroma's periphery, and the dense filaments. In the anucleated mammalian stromas, dense filaments are less numerous and present a diameter of about 0.16 μ (Figs. 3 and 5).

Blood from adult birds and mammals with anemia induced by phenylhydrazine and human blood from patients with acquired hemolytic anemia

Avian stromas present dense central nuclei; around them, dense filaments in a much variable disposition and configuration are seen. Among the filaments there are granules of less density than that of the nucleus. Many filaments become fragmented, giving rise to segments of indefinite contour. In the preserved filaments the diameter is of abount 0.19 μ In mammals, the filaments achieved a mean diameter of 0.17 μ, and within the interfilamentous space, granules with a mean diameter of 0.15 μ are seen (Figs. 7 to 10).

Blood from birds and mammals with anemia induced by successive bleedings

In birds, stromas present themselves circular or elliptical with dense filaments, however, in a smaller number than in embryos. Configuration and position of the filaments are varied. In the interfilamentous space, there are scarce granules of little density, and with diameters of about 0.15 μ, with dense filaments achieving up to 0.20 μ in diameter. Mammalian filaments, however, may reach up to 0.30 μ in diameter, disposition and configuration varying from one stroma to another. Between the filaments, granulation of little density and diameters of about 0.15 μ can be detected (Figs. 11 and 12).

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

HEMOLYSIS IN SUSPENSION

Figs. 13 and 14 - Immature chicken embryos erythrocyte and mammal embryos erythroblast: 13 - (N) nucleus; (cf) circular forms; (arrow) fold. 14 - (N) nucleus; (cf) circular forms; (asterisk) stroma.

ULTRATHIN SECTIONS

Fig. 15 - Mature avian erythrocyte: (Ec) mature erythrocyte; (Np) picnotic nucleus; (crd) dense chromatin; (N) nucleus (chromatin is not condensed); (arrow) immature erythrocyte.

Circular forms

Immature cell submitted to hemolysis in suspension give rise to distinctly circular bodies, with diameters of about 1.57 μ. In birds, the same circular forms are obtained through hemolysis in smears after a very rapid drying (Figs. 13 and 14).

Ultrathin sections

Blood of adult birds and mammals

In birds, erythrocytes present a pycnotic nucleus. Through the nuclear membrane pores, penetration of hemoglobinized cytoplasm can be observed, conferring to the caryoplasm a density close to that of the cytoplasm. Vesicles are seen, in which, when justaposed, chromatin passing from the nucleus to their interior is clearly visible. These vesicles show formations of a fibrous or membranous aspect. In the cytoplasm, less dense lamellar formations are also present, suggesting degenerating mitochondria, as well as lamellar formations with dense particles in the interlamellar space. Occasionally it is possible to obserse pinocytosis, Golgi complex, and smooth endoplasmic reticulum, whose diameters vary from 0.02 to 0.07 μ. In the peripheric portion, depending on the sectioning level, long parallel microtubules are detected with a diameter of about 270 A. In transversal sections, microtubules show an interior void of density.

Mature mammalian erythrocytes show a dense cytoplasm containing hemoglobin molecules with diameters ranging from 55-60 Å. There are no traces of any type of structures or organelles (Figs. 15 to 18).

Blood of avian and mammalian embryos, adult birds and mammals with phenylhydrazine-induced anemia, and blood of humans with acquired hemolytic anemia

In the nuclei of immature avian erythrocytes, chromatin is not compacted. Through the membrane pores, the passage can be observed of hemoglobinized cytoplasm to the caryoplasm, that becomes nearly as dense as the cytoplasm. In the latter, typical mitochondria are observed with variable form, position, and dimension, and with a mean diameter of 0.20 μ. Frequently, longitudinally lamellated bodies are found, and less frequently, bodies with oblique or even without any lamellae. In the interlamellar space, dense particles are seen, ranging between 80-100 Å diameter, identical to those of the hemoglobin molecules of the cytoplasm. Polysomic granulations can be observed in high numbers, as compared to monosomic forms, whose diameters are of about 150 Å. Many cells show an intense pinocytotic activity. Near the site of pinocytosis, vesicles containing dense particles and a diameter of about 100 Å, are detected, which, by their aspects, dimension, and density suggest to be ferritin. In some cells it is possible to observe ferritin as free agglomerates in the cytoplasm, denominated hemosiderin. At other regions this ferruginous mass becomes amorph, and is enveloped by a smooth membrane similar to that of the smooth endoplasmic reticulum. Sometimes, this material is seen involvel in a smooth membrane, with rarefied internal points, presenting a honeycomb-like aspect. Microtubules, composing the marginal band, are detected, in disposition, form, and aspect identical to the microtubules of mature erythrocytes, including their average diameters of 270 Å.

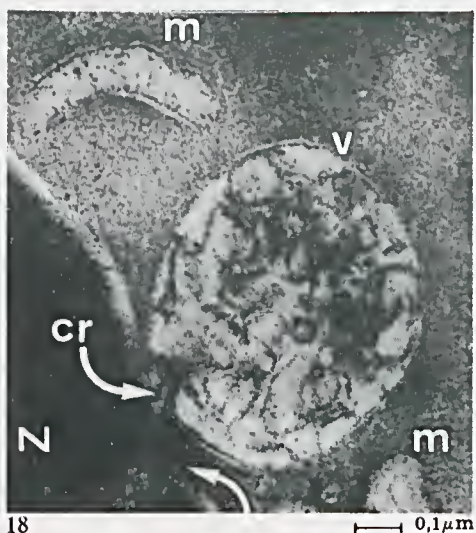
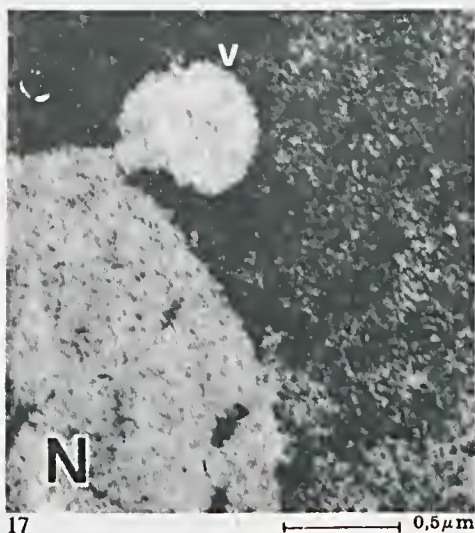
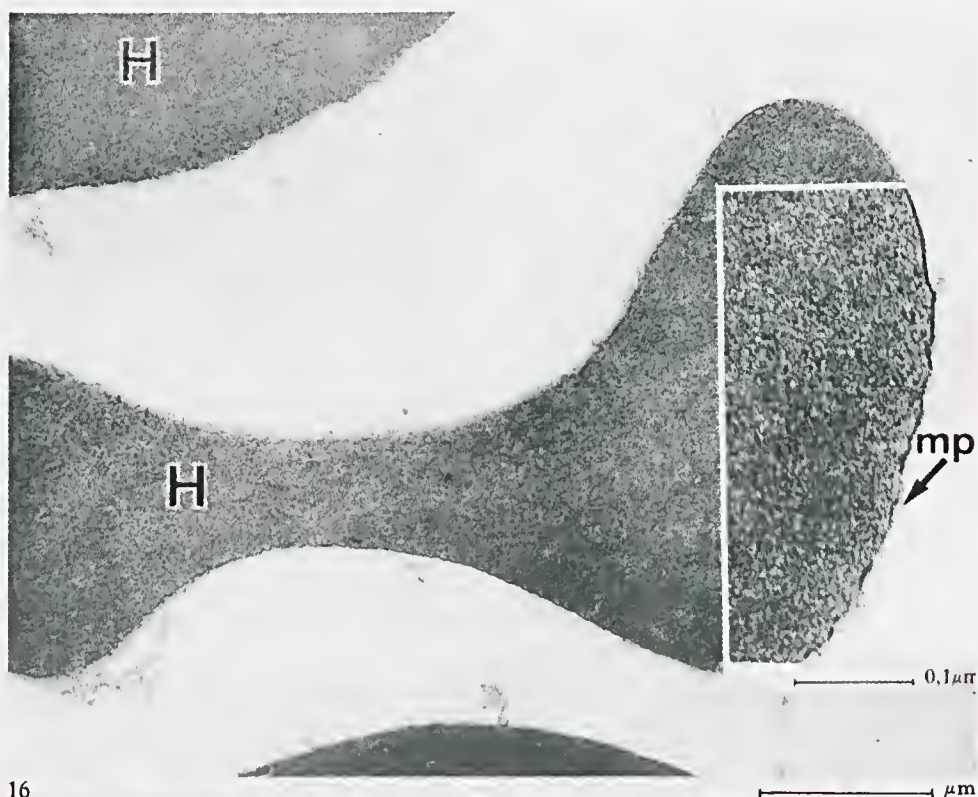
COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

ULTRATHIN SECTIONS

Fig. 16 - Normal human "hematia" (mature erythrocyte): (mp) plasmic membrane (inset shows details of the membrane unit); (H) hematia.

Figs. 17 and 18 - Mature avian erythrocytes: 17 - (N) nucleus; (V) vesicle originated from a mitochondrion (permanganate fixation). 18 - (N) nucleus; (cr) chromatin; (m) mitochrondria; (V) vesicle originated from a mitochondrion; (arrow) show hemoglobin penetration into the nucleus. (Glurataldehyde gradient fixation).

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

In mammals, most immature forms present themselves anucleated, i.e., in a reticulocytary form. However, in the erythroblastic forms, the nuclei show non-compacted chromatin, and caryoplasm with a high density caused by the penetration of cytoplasm through the membrane pores. A few cells present an eccentric pycnotic nucleus, and a membrane without pores. It is possible to observe in these immature forms an already extruded nucleus covered by a fine layer of cytoplasmic material (Figs. 21 and 22). In the cytoplasm there are typical mitochondria with a diameter of about 0.20 μ, and smooth endoplasmic reticum with a mean diameter of 0.07 μ as well as the Golgi comples with all its constituents. Besides these elements, lamellar formations are seen with dense interlamellarly disposed particles whose diameter is about 60 Å, identical to the diameters of hemoglobin molecules of the cytoplasm. In some reticulocytes, there are dense masses bound by membranous systems with rarefied points, conferring to them a honeyeomb-like aspect. The cytoplasmic membrane shows pinocytosis. Near the pinocytotic region in the cytoplasm there are agglomarates whose isolated particles are of the same density and diameter as ferritin. Diameters of these agglomerates vary from 0.03 to 0.08 μ. Polysomic granulations of pentamerous form are observed, distributed in the cytoplasm, and less often, monomerous forms near the polysomic ones (Figs. 24 to 31, 33, 37 to 40).

Blood of adult birds and mammals with anemia induced by successive bleedings

Immature forms of chickens present the same characteristics as those of embryos and adults with hemolytic anemia. However, only mitochondria are present, and dense lamellar forms are absent. Their mitochondria present a slightly higher average diameter, i.e., about 0.25 μ. In these immature forms, polysomes, mostly of pentamerous aspect, are observed. Also particles of ferruginous material can be detected in form of hemosiderin or as free granules in the cytoplasm. The nucleus of the erythroblastic forms show besides loose chromatin, the penetration of cytoplasmic material through the membrane pores, the caryoplasm thus acquiring approximately the same density as the cytoplasm (Figs. 34 to 36).

Aspects of the organelle genesis in immature erythrocytes of the peripheric avian and mammalian blood

The beginning of the phenomenon is characterized by the condensation of the plasmic membrane at determined sites, followed by the formation of an invagination, i.e., pinocytosis. Next to this site, pinocytotic vesicles with a dense and thick membrane are observed. In continuation, several pinocytotic vesicles blend together, originating a larger one with abundant dense particles attached to the membrane. This vesicle gradually loses its restraining membrane, and the inner particles become free, originating agglomerates of ferruginous material in the cytoplasm. This ferruginous material is then encircled by a smooth membrane similar to the smooth endoplasmic reticulum and acquires an amorphous aspcet, due to less dense regions, a honeycomb-like aspect. In many mammalian cells an association has been observed between mitochondria connected by a dilatation of low density, and the honeyeomb-like bodies or bodies already with an outline of lamellar formation, with dense interlamellar particles. These lamellated bodies in cells at the end of maturation, present ruptures in their membranes, and the dense inner particles spread to the surrouding cytoplasm.

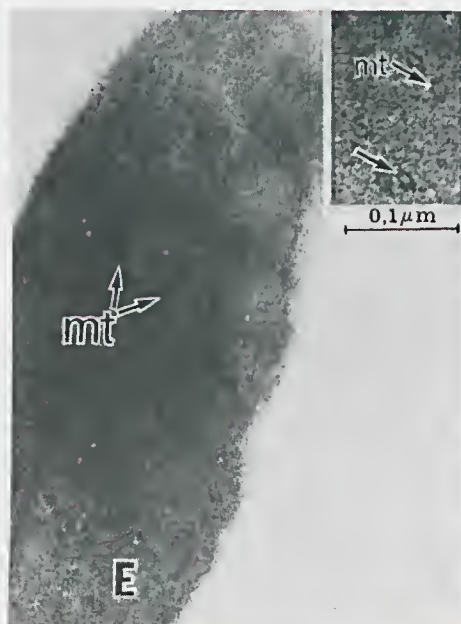
COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis. *Mem. Inst. Butantan, 39*: 169-206, 1975.

ULTRATHIN SECTIONS

Fig. 19 - Proerythrocyte II: (N) nucleus; (m) aberrant mitochondria; (mf) myelin figure; (ms) monosomic forms.

Fig. 20 - Mature avian erythrocyte: (mt) microtubules in longitudinal section; (E) mature erythrocytes. (inset shows transversal sections).

Fig. 21 - Typic mammals orthochromatic erythroblast: (N) nucleus (cr) compacted chromatin.

Fig. 22 - Orthochromatic mammal erythroblast: (N) free nucleus; (arrow) cytoplasm.

Estimate of the erythrocyte maturation degree

In orthochromatic mammalian erythroblasts the polysome number varies from 58-65 per μ^2. In immature avian cells, the countings revealed 80, 65, 40, and 16 polysomes per μ^2.

Fractionation, organelle isolation, and hemoglobin determination. Blood f avian embryos (*Gallus gallus*), and blood of adult chickens (*Gallus gallus*) with anemias induced by phenylhydrazine, and successive bleedings

Cytoplasmic hemoglobin of the blood of these animals, when stained with benzidine, reveals two components of about the same concentration in polyacrylamide gel. The concentrated supernatants of the lysate revealed hemoglobin of identical patterns, in healthy embryos as well as in those with phenylhydrazine induced anemia (Figs. 46 and 48). For animals with anemia induced by successive bleedings, no traces of hemoglobin were found in the concentrated supernatants of the last washings, the same as for the controls.

Blood of mammalian embryos (*Oryctolagus cuniculus*), adult mammals with phenilhydrazine induced anemia (*O. cuniculus* and *Cavia porcellus*), with acquired hemolytic anemia (humans), and with anemia induced by successive bleedings (*C. porcellus*)

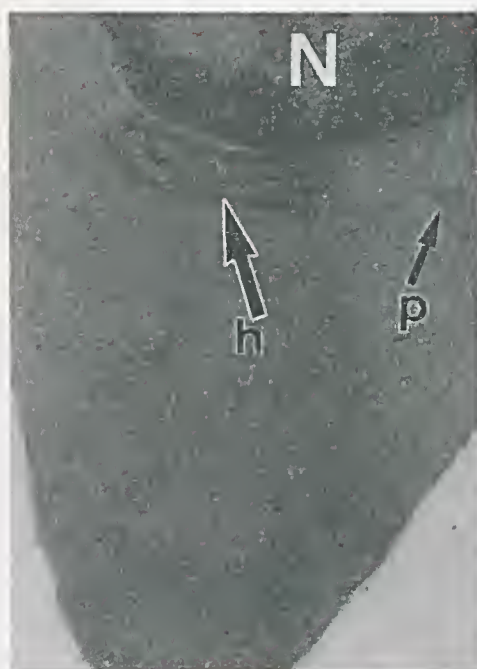
Cytoplasmic hemoglobin of the blood of these animals, when stained with benzidine, reveals one single component in polyacrylamide gel. Concentrated supernatants of the lysate reveal hemoglobin of the same pattern, in embryos and in animals with anemia induced by phenylhydrazine or with acquired hemolytic anemia (Figs. 47 and 49). On the other hand, the animals with anemia due to successive bleedings did not reveal any trace of hemoglobin, the same as the controls, represented by the concentrated supernatants of the last washings.

Macroscopic aspects, and control of purity degree of the pellets by electron microscopy

In embryonic blood of chickens and mammals, as well as in adult avian and mammalian blood with phenylhydrazine induced anemia and in the blood of humans with acquired hemolytic anemia, it is observed that integral pellets possess a reddish-pink central region, that becomes light brown through the washings. After osmotic lysis, the pellets begin to show a fine granular membrane with an undefined color. In animals with anemia induced by successive bleedings, the pellets show a yellowish central region, even after the washings. After osmotic lysis, the sediments acquire the aspect of a fine, nearly imperceptible membrane. Examined by the electron microscope, the integral pellets are constituted by sac-like formations, in general ellyptical, filled with dense material. On the other hand, the lysed pellets show a less dense interior. Furthermore the lysed pellets acquire a greater volume (Figs. 42 to 45).

Spectrophotometry

In birds and mammals, spectrophotometric determinations in the concentrated supernatants of lysates and in hemoglobin were carried out at 5.400 Å.

COIRO, J.R.R.: Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

ULTRATHIN SECTIONS

Figs. 23 to 26 - Immature avian embryos erythrocytes: 23 - (N) nucleus; (p) polysome; (h) hemosome with longitudinal lamellae. 24 - (N) nucleus; (h) hemosome filled with hemoglobin molecules. (Osmium tetroxide fixation). 25 - (N) nucleus; (mf) ferritin molecules; (s) hemosyderine. 26 - (G) Golgi complex; (re) endoplasmic reticulum; (v) vesicles.

Absorbance was observed in the lysate supernatants, suggesting the presence of the hemo group. In some control supernatants (last washings) some absorbance was observed, but much less than that of the corresponding lysate supernatant.

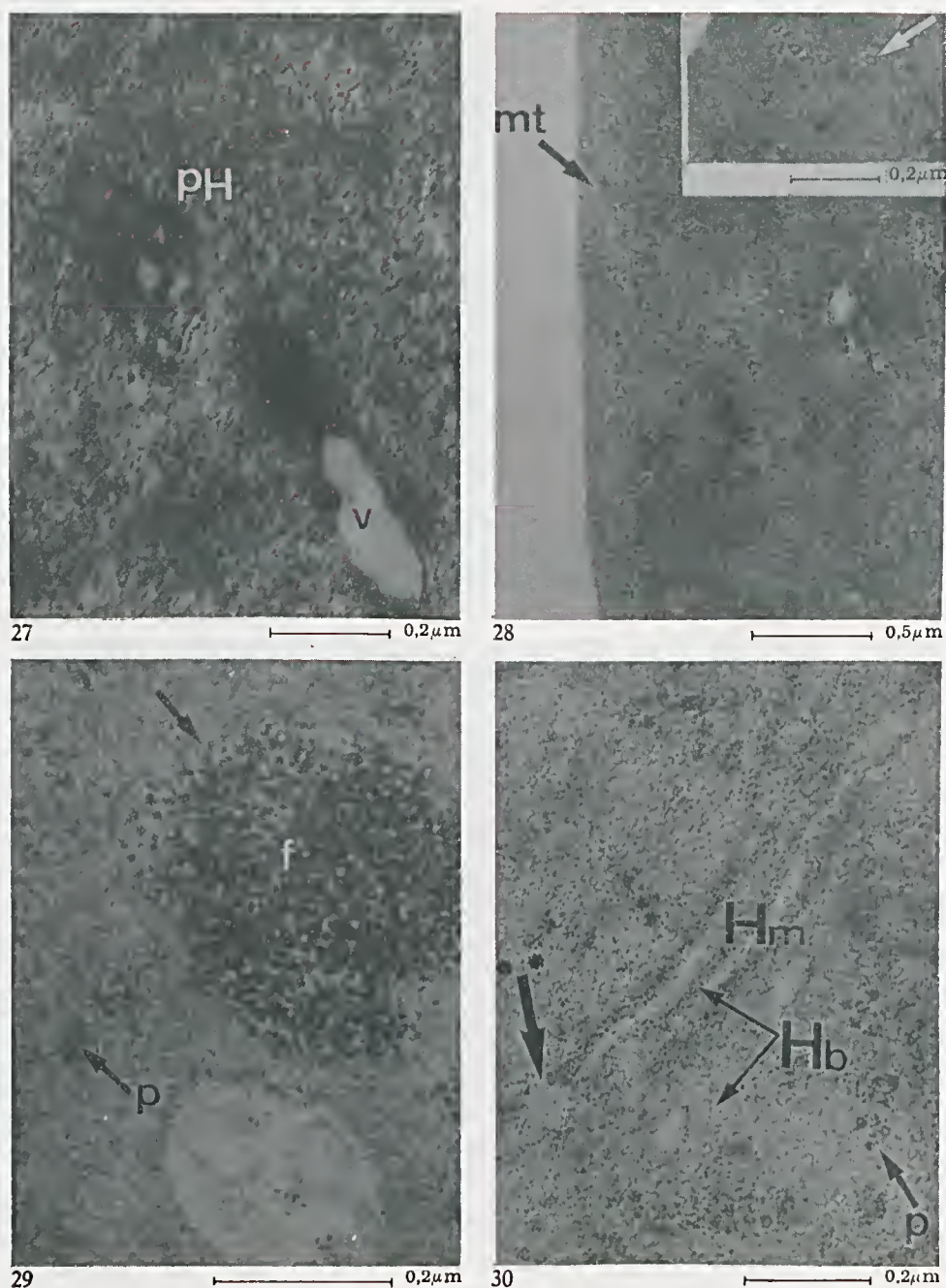
DISCUSSION

Mature erythrocytes — Feulgen positive vesicles

O'Brien [68] (1960), Davies [34] (1961), Wilt [99] (1962) and Grasso et al. [47] (1962) found hemoglobin in erythroblast nuclei. Tooze & Davies [94] (1963), suggested that hemoglobin could act as histone, causing DNA condensation. According to Moore & Brown [66] (1968), the presence of large amounts of intranuclear hemoglobin could act by a negative retroalimentation mechanism, and interrupt heme and globin synthesis. Based on our findings related to the Feulgen positive vesicles, as well as on the observations in hemolysed smears and ultrathin sections, we present another hypothesis. Ultrathin sections show continuity (Fig. 17) or close connection between vesicles and nucleus (Fig. 18). In the cases of close connections, passage of condensed or filamentous chromatin into the vesicles is observed (Fig. 18). In chickens (Coiro, 1972 — unpublished observations), as well as in *Gallus, Bufo* and *Liophis* (Menezes et al. [64], 1972), Feulgen positive vesicles apparently originating from the nucleus are observed. The mitochondrial origin of those vesicles was clearly determined by Brunner et al. [17] (1975) in blood from *Cyprinus carpio* and by Coiro et al. [32] (1974) in blood from *Gallus, Bufo, Bothrops* and *Cyprinus*. Menezes et al. (1974 — unpublished observations), and Coiro et al. [32] (1974) observed, after labelling *Bufo ictericus* erythrocytes with ^{3}H-tymidine, that those vesicles of mitochondrial origin, filled with chromatin, show DNA or the product of its degradation. Such findings suggest that the blocking of DNA activity may also be related to chromatin reduction, and not only to a negative retroalimentation mechanism, because, as already know, hemoglobin is synthesized in mammalian erythroblastic forms, in avian erythroblasts as well as in proerythrocytic forms, even when their nuclei had received a large amount of hemoglobin through the pores of the membrane. Actually, we observed that at the moment when the vesicles appear, filled with chromatinic material, erythrocytes may still contain monosomes, indicating desaggregation of polysomes and cessation of globin synthesis, and therefore hemoglobin synthesis (Fig. 19). Comparing the phenomenon of nuclear extrusion in orthochromatic mammalian erythroblasts (Figs. 4, 21 and 22), much more frequent than caryolysis or caryorhexis according to Astaldi et al. [1] (1950), with the partial extrusion of chromatinic material in avian erythrocytes, it may be suggested that these phenomena possibly could be correlated, in spite of the differences as to the periods of hemoglobin synthesis. While reticulocytes work intensely at synthesis, the loss of chromatinic material in avian erythrocytes is concomitant with hemoglobin synthesis cessation.

Considerations on the structures of immature avian and mammalian erythrocytes

Bernhard et al. [2] (1949) observed circular forms in hemolysed cells in suspension. Origin and nature of these circular forms were much discussed by Braunsteiner & Bernhard [9] (1950), Peters & Wigand [74] (1950), Wolpers [100] (1956), Jung[54] (1959) and Hug et al.[49] (1959). Through hemolysis in immature

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

ULTRATHIN SECTIONS

Figs. 27 and 28 - Immature avian embryo erythrocytes: 27 - (V) vesicle; (pH) prohemosome. 28 - (mt) longitudinally sectioned microtubules. Inset shows transversal section. (Osmium tetroxide fixation).

Fig. 29 and 30 - Mammal embryo reticulocytes (prohematia): 29 - (f) ferritin; (p) polysome; (arrow) smooth membrane. 30 - (p) polysomes; (Hm) mature hemosome; (Hb) hemoglobin molecules; (double asterisk) linking-body.

cell smears, Brunner & Vallejo-Freire[21] (1956), obtained dense filamentous structures with a diameter of about 0.20 μ, and extremely fine filaments with a mean diameter of 600 Å, as well as granules of 0.25 μ in diameter (Fig. 5). Such granules were interpreted as polysomes, since they desintegrate when submitted to RNase, traces of proteic material remaining at the site (Brunner[14], 1968). As to the filaments, they were interpreted as smooth endoplasmic reticulum similar to the interpretation of Porter[79] (1953), when he observed very fine filaments of 500-700 Å in diameter, in integral mesothelial rabbit cells. The dense filaments about 0.20 μ in diameter were considered to be mitochondria. This interpretation is justified by the fact, that these dense filaments have an affinity with ferric hematoxilin (Régaud) and acid fuchsin (Altmann), also used for the identification of the forementioned organelles. Brunner et al.[23] (1956) and Braunsteiner et al.[10] (1956), found filamentous mitochondria in mammal reticulocytes. It has also been observed that these filaments are reduced in numbers when immature cells evolve to maturity, the same as observed with mitochondria. It is important to point out that in mammalian erythroblasts and reticulocytes with lead intoxication, the dense filaments in hemolysed smears increase three fold in diameter on the average, and that this fact occurs also in mitochondria (Vallejo-Freire & Brunner[95], 1958).

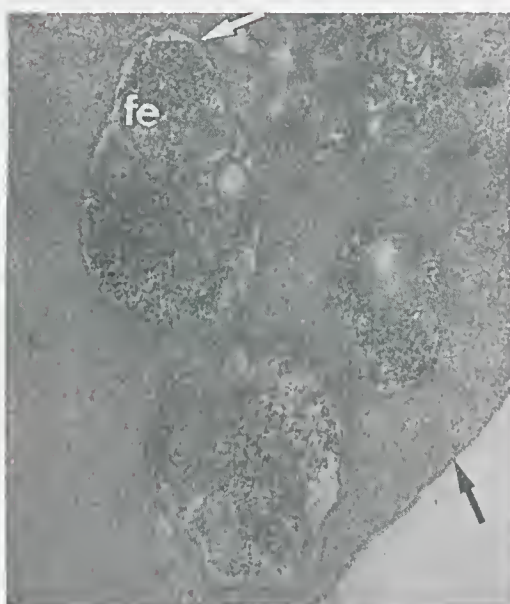
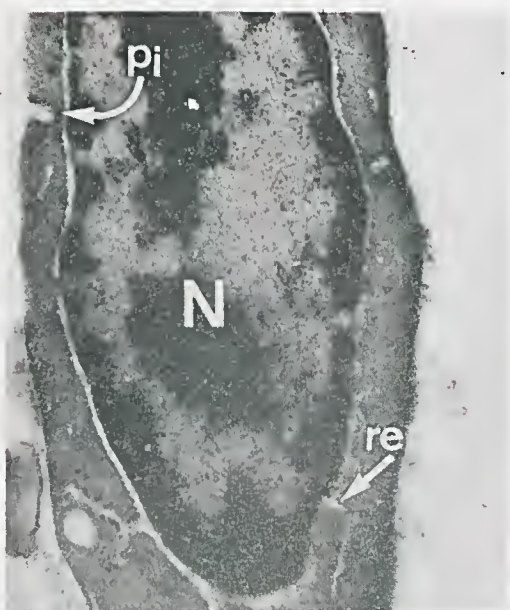
Porter[79] (1953), in integral endothelial rabbit cells, observed dense filaments with diameters of about 0.20 μ morphologically interpreted as mitochondria. Such result coincides with the ultrastructural measurements and aspects of the dense avian and mammalian immature erythrocyte filaments that we have observed (Figs. 5 and 6).

Brunner & Vallejo-Freire[21] (1956) and Vallejo-Freire & Brunner[95] (1958) verified that in immature mammalian cells submitted to hemolysis in suspension, without interruption by a fixative, the filamentous mitochondria become desintegrated, giving rise to circular forms (Fig. 14). However, these authors obtained intermediate forms when hemolysis was performed in a less hypotonic medium, containing formol. In ultrathin sections they also observed that filamentous mitochondria increase in volume at determined sites, separated by constrictions. However, if an interruption had not occurred, the intermediate forms would have given rise to circular forms.

In birds, due to the intense agglutination during hemolysis in suspension, circular forms were obtained through hemolysis in smears, with a modification, i.e., rapid drying at a temperature of 40°C. The circular forms thus obtained presented a diameter of about 0.68 μ (Fig. 13).

Relationship between "Substantia granulo-filamentosa" (Sgf), mitochondria, and other structures

The immature avian and mammalian forms, stained by brilliant cresyl blue, show a dark-blue reticulated formation denominated "Sgf". Simmel[90] (1926), and Seyfarth[89] (1927) through dark-fied microscopy, and Sano[85] (1955) through phase contrast microscopy, observed intrareticulocytary structures. Since these structures only were visualized with definition in stained reticulocytes, many investigators interpreted the reticulum as an artifact. On the other hand, reticulocytes treated with a supravital dye and subsequently treated with Giemsa did not show diffuse basophily, thus leading to the supposition that both dyes evidence one and the same structure. Dustin[38] (1947) showed

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

ULTRATHIN SECTIONS

Figs. 31 and 32 - Reticulocytes or "prohematia" of mammal embryos, and a patient with acquired hemolytic anemia: 31 - (pH) prohemosome; (double asterisk) linking-body; (pi) pinocytosis (Fixation by formalin in hypotonic medium). 32 - (fe) ferritin; (arrows) membrane unit.

Figs. 33 and 34 - Immature avian erythrocytes of embryos and adults with bleedings anemia: 33 - (m) mitochondrion; (Hb) hemoglobin molecules; (double asterisk) linking-body. 34 - (pi) pinocytosis; (re) endoplasmic reticulum. Immature cells obtained by successive bleedings, present a developed endoplasmic reticulum.

that basophily was given by the cytoplasmic ribonucleic acid, since there was no basophily in reticulocytes previously treated by RNase. When reticulocytes evolve to erythrocytes a RNA decrease occurs (Burt et al. [25], 1951; Thoma [92], 1959) and at the same time hemoglobin concentration increases up to 30% (Bessis [6], 1972).

Kosenow [57] (1952) and Brunner [13] (1962) also concluded the same as to the concentration of the acrydine-orange and Janus green B dyes. With a dilution higher than 1 x 10^{-4} and hemolysis in smears it was possible to observe larger filaments, polysomal granules, and thin filaments corresponding to the smooth endoplasmic reticulum. Brunner [13] (1962) observed Janus green B stained reticulocytes in a 5 x 10^{-5} dilution in hemolysed smears, with none of the structures presenting aglomerations. The same author, in ultrathin sections of reticulocytes previously treated with Janus green B, observed that the mitochondria displayed dye in their interior, smooth endoplasmic reticulum, and ribosome particles next to the dye. Since the mitochondrion is the predominant structural element in the reticulocyte, it is possible to consider it to be the main component os the "Sgf". It is necessary to point out that the concept os "Sgf" in non-stained reticulocytes is restricted only to mitochondria (Brunner [13], 1962).

In avian erythroblasts and proerythrocytes we used the same concentration as proposed by Brunner [13] (1962) for the mammalian reticulocytes. When brilliant cresyl blue was used in a 1 x 10^{-3} concentration, the reticulocyte became well evidenced. Due to the simillarity of immature avian and mammalian forms, i.e., evidencing the same structures, we may infer that the "Sgf" in birds is also constituted by filamentous mitochondria agglomerates, smooth endoplasmic reticulum and ribosomes with dye, and furthermore affirm that these mitochondria are elements fundamental for the "Sgf" formation in immature avian cells (Fig. 3).

With hemolysis in immature cell smears of humans with acquired hemolytic anemia, filaments were observed with diameters varying between 0.14 - 0.30 μ (Figs. 9 and 10). In rabbit-embryos, the filaments show variations of 0.11 - 0.31 μ (Fig. 5).However, it has been observed that filaments with greater diameter (0.30 μ) correspond to the filaments of reticulocytes of guinea-pigs anemic through bleedings (Fig. 12). These filaments of a larger diameter are mitochondria of a proportional size in ultrathin sections. It was verified that filaments of animals with bleeding anemia show a larger diameter when compared to filaments of embryos, or nimals with phenylhydrazine induced anemia (Figs. 6 and 8). This fact leads to the conclusion that the obtention of only large filamentous mitochondria is related to the type of induced anemia. In the bleeding type, we remove erytrocytes and other components important for hemoglobin formation, related to thinner filaments. The latter are probably organelles related to hemoglobin synthesis.

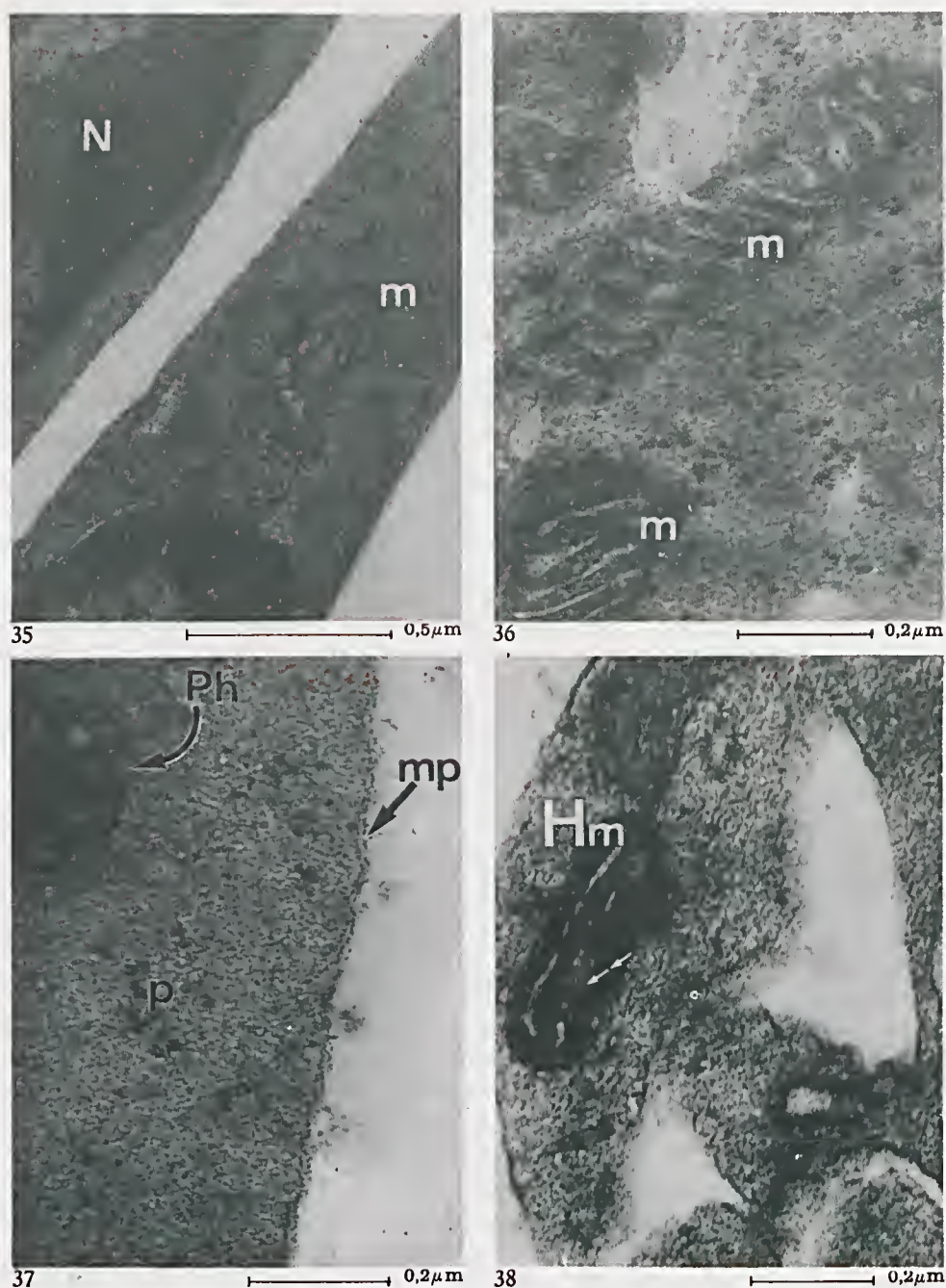
Brunner [14] (1968), in a comparative study on the number and extension of "Sgf" in orthochromatic erythroblast and reticulocytes verified that the area was about 7.5 μ^2 in erythroblasts, whereas in mature reticulocytes it reached about 17.2 μ^2, i.e., a 100% increase of the filamentous structures (Figs. 6 and 4). Reimann [81] (1942) and Jensen et al. [52] (1953) in birds, and Brunner [24] (1968) in mammals, indicated the dependence between the higher intensity of hemoglobin synthesis and the amount of "Sgf". Brunner & Mombrum [19] (1972)

ULTRATHIN SECTIONS

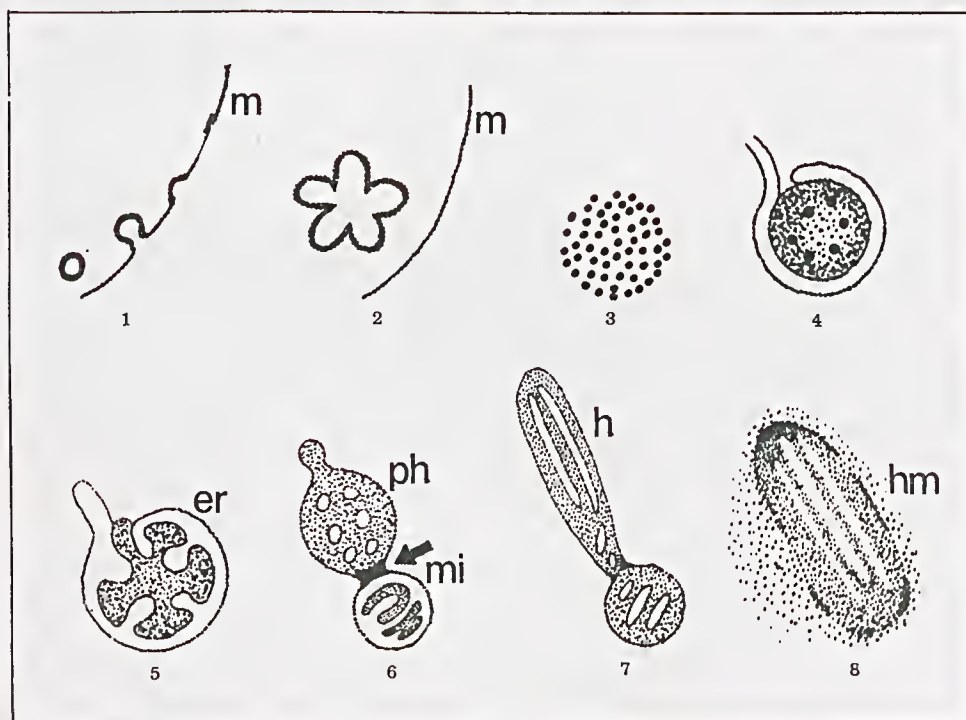
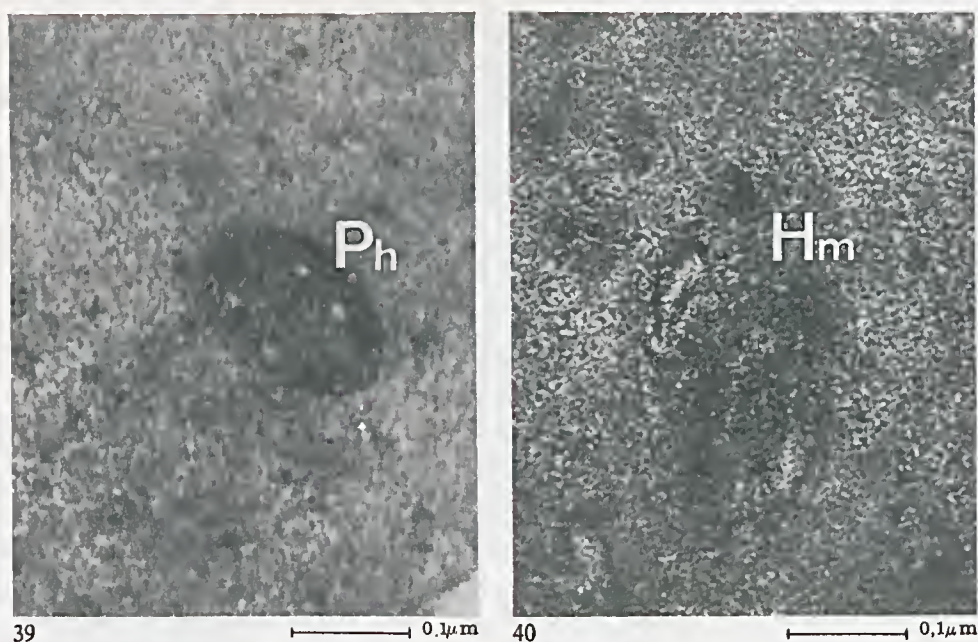
Fig. 35 and 36 - Immature avian erythrocyte and mammal reticulocyte (prohematia) from sucessive bleedings. 35 - (N) nucleus; (m) typical mitochondrion. 36 - (m) mitochondria.

Figs. 37 and 38 - Immature avian erythrocyte (phenilhydrazine intoxication), and human prohematia (reticulocyte) from acquired hemolytic anemia. 37 - (p) polysome; (Ph) prohemosome; (mp) plasmic membrane showing clearly the three components. 38 - (Hm) mature hemosome; (arrow) hemoglobin molecules.

investigated the mechanism of the filament increase in rabbit-embryo reticulocytes, and demonstrated the existence of an organelle probably formed "de novo", which they denominated mitochondrion-like organelle (MLO). Brunner et al. [20] (1972), suggested that the final hemoglobin biosynthesis occurs in the MLO, called hemosomes (Fig. 29). The filaments of immature cells of animals anemic through bleedings are in fact mitochondria. This statement is supported by the findings related to the dimensions found in hemolysed smears, ultrathin sections, and electrophoresis of the lysed fraction supernatant, that showed absence of hemoglobin synthesis (Brunner et al. [18], 1973; Coiro et al. [31], 1973), in mammals and birds, respcctively. However, in mammalian embryo reticulocytes (Brunner[14], 1968) and in avian procrythrocytes (Coiro et al.[31], 1973) as well in immature forms from individuals with hemolytic anemia, the filaments ("Sgf") correspond, in their majority, to hemosomes (Figs. 3 and 8). Evidently, the "Sgf" filament increase in reticulocytes is related to the number of hemosomes and not to the number of mitochondria.

Hemosome genesis in birds

Brunner & Mombrum [19] (1972) described the genesis of mitochondrion-like organelles (MLO). Brunner et al. [20] (1972), proposed the term hemosome for these MLO. In birds (Fig. 41), hemosome genesis follows the same stages described for mammals: 1) Plasmic membrane with increased density and formation of a pinocytotic vesicle rich in ferritin (Figs. 31 and 32); 2) fusion of the pinocytic vesicles and formation of a larger vesicle; 3) disappearance of the vesicle's walls and release of the ferritin molecules in the cytoplasm (Fig. 25); 4) at the time when the ferritin molecules become amorph they are encircled by a smooth membrane similar to the smooth endoplasmic reticulum (Figs. 25, 26 and 29); 5) the inner part of the smooth membrane folds into the element in formation parallel to the joining of both free ends. In this way the molecules of ferruginous material jointly with the globin synthesised in the polysome remain separated from the cytoplasm. These transformations give rise to a honeycomb-like body; this set was called prohemosome (Figs. 27, 31 and 39); 6) the prohemosome may appear attached to a mitochondrion through an enlarged element we called "linking body" (Figs. 30, 31 and 33 — arrows); 7) the assemblage of prohemosome and mitochondrion joined by the linking body gives rise to the hemosome. This hemosome already shows longitudinal lamellae, but still with one of the transversally lamellated ends derived from the same mitochondrion (Figs. 30 and 31 — arrows); 8) mature hemosome, whose walls disintegrate, allowing scattering of hemoglobin into the cytoplasm (Fig. 40).

The enzyme that acts upon the iron for heme formation was detected in mitochondria of rat hepatocytes, and in duck erythrocytes by Labbe & Hubbard [58] (1961), as well as in mitochondria of pig hepatocytes by Porra & Jones [78] (1963). These findings suggested that the connection between the mitochondrion and a prohemosome is related to the iron for heme formation within the prohemosome, and moreover interferes in the growth of this prohemosome furthering structural protein synthesis. Synthesized globin in polysome (Warner et al. [96], 1962) is taken off the cytoplasm together with ferruginous particles and polysomes, as observed by Brunner et al. (unpublished observations), in HeLa cells induced to hemoglobin synthesis. Finally, energy necessary to com-

ULTRATHIN SECTIONS

Figs. 39 and 40 - Human prohematia (reticulocytes) from acquired hemolytic anemia: 39 - (Ph) Prohemosome (see the honeycomb-like aspect). 40 - (Hm) mature hemosome.

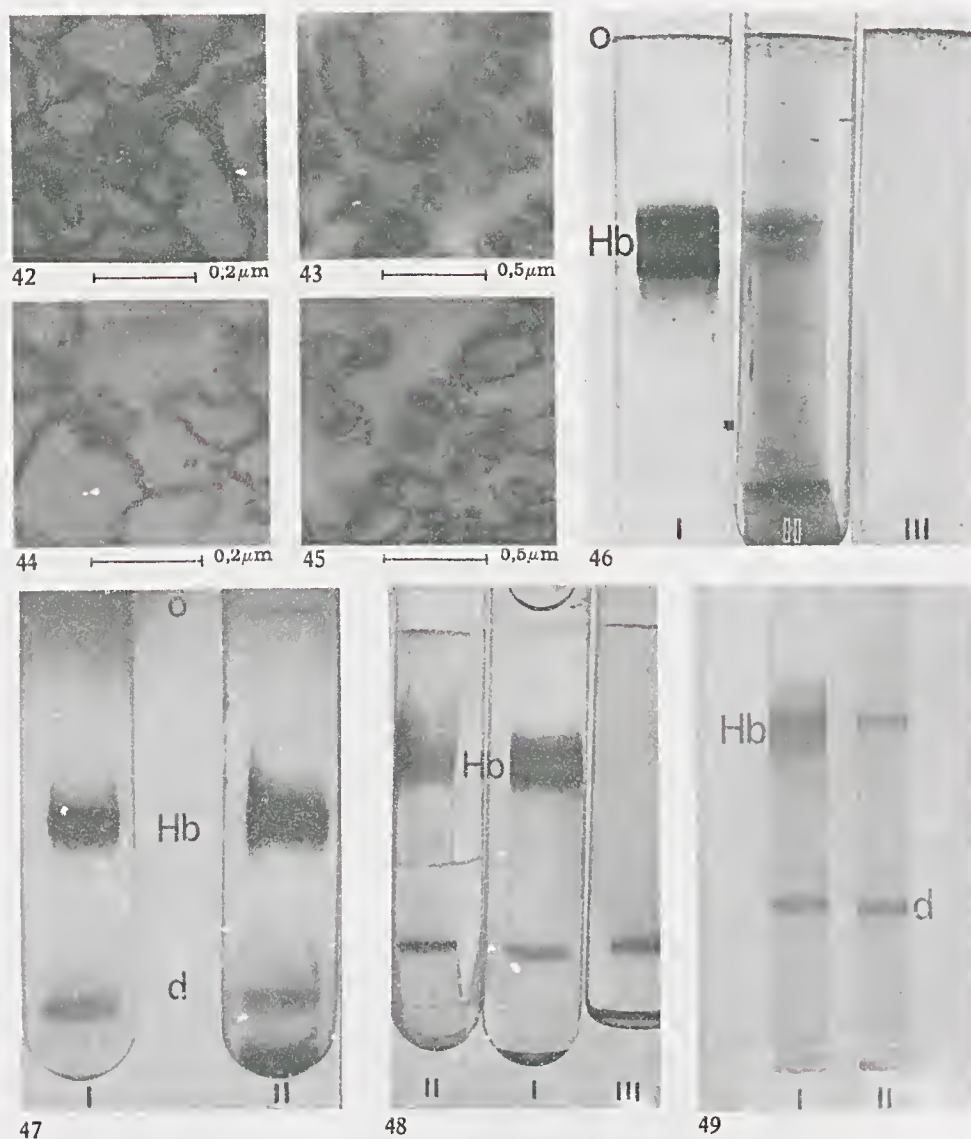
Fig. 41 - Schema of hemosome genesis.

bine heme and globin, also wold be provided by the mitochondrion associated to the prohemosome.

Hammel et al.[48] (1963) described hemoglobin synthesis in nuclear fractions of avian erythrocytes. However, the nuclear fraction had been contamined by cytoplasmic particles. It is probable that these particles were hemosomes, the elements responsible for the final hemoglobin biosynthesis, contributing, in this case, with erroneous results. In general, hemosomes have longitudinal lamellae (Fig. 30). Perhaps this lamellar disposition is due to the pressure exerted by the hemoglobin molecules on the circular lamellae; these pressures would flatten the circular lamellae of the prohemosome, dislocating them alongside the greater axis of the hemosome in formation. The mature hemosome is characterized by abundant hemoglobin molecules within the interlamellar space (Fig. 40). It is possible that the hemoglobin release into the cytoplasm depends on a gradient where the hemosome would distribute the molecules in less hemoglobinized regions of the cytoplasm, a displacement of the hemosome thus occuring from the more concentrated region to the less concentrated region. This may well be so, because immature avian or mammalian cells, hemolysed in smears, were never found with the same type of filamentous hemomose distribution (Figs. 3, 5, 6, 7 and 9).

Relationship between hemoglobin confirmation by electrophoresis and hemosome presence in the immature avian and mammalian forms

Brunner et al.[20] (1972) determined the hemoglobinic nature of the particles present in the interlamellar spaces of the hemosomes. In birds, the identification of the nature of interlamellar particles was confirmed by the presence of hemoglobin molecule by spectrophotometric determinations in the lysed supernatant read at 5.400 Å, and by electrophoresis in polyacrylamide gel. In mammalian embryos, electrophoresis revealed that the cytoplasmic hemoglobin has only one component (Fig. 47-I). The supernatant of the hemosome "pellet" lysate showed also only one component (Fig. 47-III). However, in relation to the blood of mammals anemic after bleedings, it has been observed that the "pellet" lysate as well as the supernatant of the 3rd washing did not reveal any component. This result leads to the conclusion that the pellet of animals with bleeding anemia was composed nearly exclusively by mitochondria instead of hemosomes and mitochondria; this results was completed by hemolysis in smears and ultrathin section (Brunner et al.[18], 1973). In avian embryos, cytoplasmic hemoglobin in gel revealed two components (Fig. 46-I), the same as the supernatant of the hemosome pellet lysate (Fig. 46-III). In the blood of adult birds with bleeding anemia the results were negative, coinciding with the results obtained in mammals with bleeding anemia. These results in birds had been expected, since the lysed pellet is mostly formed by mitochondria. These mitochondria appear in the immature cells of animals with bleeding anemia because we removed a considerable variety of factors closely related to hemoglobin biosynthesis. Among these are iron, folic acid, proteins and copper besides a fundamental factor of the blood plasma according to observations in HeLa induced to hemoglobin synthesis, by Brunner et al., 1975 (unpublished observations). This statement was corroborated by the positive results obtained by electrophoresis, when daily withdrawn blood was homogenized and returned to the same bled animals by intraperitoneal route. In parallel, in hemolysed

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

Figs. 42 to 45 - *ULTRATHIN SECTIONS OF HEMOSOME PELLETS:*
42 - Integral avian hemosome pellet. 43 - Integral mammal hemosome pellet. 44 - Lysed avian hemosome pellet. 45 - Lysed mammal hemosome pellet.

ELECTROPHORESIS IN POLYACRYLAMIDE GEL

Figs. 46 - Avian embryos blood: I - (Hb) cytoplasmic hemoglobin; (o) origin. II - supernatant of lysed hemosomes. III - last washing supernatant (control).

Figs. 47 - Mammal embryo blood: I - (Hb) cytoplasmic hemoglobin. II - supernatant of lysed hemosomes; (o) origin; (d) dye.

Figs. 48. - Immature avian erythrocytes from phenilhydrazine intoxication: I - (Hb) cytoplasmic hemoglobin; (d) dye. II - (Hb) supernatant of lysed hemosomes. III - last washing supernatant (control).

Figs. 49 - Human immature erythrocytes (prohematia and erythroblasts) from acquired hemolytic anemia: I - (Hb) cytoplasmic hemoglobin. II - supernatant of lysed hemosomes; (d) dye.

smears and ultrathin sections, the presence of typical hemosomes was verified (Brunner et al. [18], 1973).

In adult mammals with acquired hemolytic (Fig. 49) or phenylhydrazine induced anemia, the electrophoretic results are the same as in embryos (Fig. 47). In birds with phenylhydrazine induced anemia, the presence of components in polyacrylamide gel demonstrates that the hemoglobin synthesis in these recuperating animals is cytologically the same as the hemoglobin synthesis in embryos (Fig. 47).

Evaluation of the maturation degree

In the avian erythron, it is possible to determine, through morphological data, the characteristics of an orthochromatic erythroblast and a proerythrocyte. Since the mammalian orthochromatic erythroblast is morphologically recognizable, it was selected as reference for the polysome countings. In several mammalian orthochromatic erythroblasts the counts pointed out a polysome number varying between 58 and 61 per μ^2. In birds, one of the cells showed 65 polysomes per μ^2, and therefore could be classified as a probable orthochromatic erythroblast. Subsequent countings showed variations of 8, 16, and 49 polysomes per μ^2. The values between 8 and 16 demonstrated that the proerythrocytes nearly reached the point of definitive transformation into erythrocytes. However, it is possible to find slightly basophile cells where basophily is evidenced only by monosomic forms from the desintegrated polysome forms (Fig. 19). In this case, although basophilic, they cannot be considered as a proper proerythrocyte. Therefore, it is necessary to denominate these cells Proerythrocytes II. To the proerythrocytes, although presenting a reduced polysome number, the denomination Proerythrocyte I is proposed. Furthermore, it is suggested that the reticulocyte forms of mammals should be called more correctly "prohematia", since the anucleated reticulocyte no longer can be characterized as a cell.

Fawcett & Witebsky [43] (1964), stated that the marginal band is responsible for the maintenance of the ellipsoidal form of avian erythrocytes. Grasso [46] (1966) reaffirmed that the marginal band is responsible for the elasticity and form of mammalian erythrocytes. Dervichian et al. [36] (1947), Ponder [77] (1948), Perutz [73] (1948) and Pauling et al. [71] (1949), suggested the possible existence of a molecular arrangement in the "hematia", however, without any explanation as to the possible influence of this arrangement on the discoidal bi-concave shape of the mature mammalian forms. Furchgott & Ponder [44] (1940), Ponder [77] (1948) and Bessis & Bricka [8] (1950), affirmed besides an inner molecular arrangement, the shape could be confered by a physical-chemical phenomenon related to the surface of the "hematia". Brunner [13] (1962) investigating "hematias" maintained in a hypotonic medium, and treated with osmium tetroxide, came to the conclusion that the biconcave form could be essentially conditioned by an inner structural arrangement. The statements of this author are supported by the fact that no marginal band, forming microtubules, were found in mammalian erythrocytes throughout the course of this study, except the microtubule remnants of the achromatic fuse in still immature forms (Grasso [46], 1966; Jones [53], 1969; Brunner [15], 1972). Actually, if a marginal band existed in erythroblasts, mammal "prohematias" and "hematias" could easily show it in ultrathin sections, e.g., figures 20 and 28, or in hemolysed

smears (Coiro et al.[30], 1973) (Fig. 2), the latter being very efficient for the identification of marginal band forming microtubules.

CONCLUSIONS

1 — Avian erythroblasts and proerythrocytes, as well as mammalian erythroblasts and reticulocytes show, in hemolysed smears after partial drying, dense and filamentous structures. Those of larger diameter are mitochondria, and those of smaller diameter, hemosomes. Among these filaments, extremely thin thread-like structures appear, corresponding to the smooth endoplasmic reticulum. Besides these structures there are scattered polysomic granules in the stroma.

2 — In the mammalian immature forms submitted to hemolysis in suspension without prior drying, mitochondria and filamentous hemosomes undergo disintegrations which originate the circular forms. Mitochondria and hemosomes of the immature avian forms also give rise to the same circular forms, however, only when hemolysed in smears after a rapid drying at 40°C.

3 — Avian erythroblasts and proerythrocytes, when supravitally stained, show the "Substantia granulo-filamentosa" consisting of mitochondria and hemosomes besides the dye and the precipitated polysomic granules. In the immature forms obtained by bleeding of adult chickens, the "Substantia granulo-filamentosa" consists of only mitochondria besides the dye and the precipitated polysomic granules, showing therefore an identical behaviour as the immature mammalian forms.

4 — Hemosomes, those organelles responsible for hemoglobin biosynthesis, originate from the smooth membranes that agglomerate ferruginous material together with globin. From this phase onwards, transformations occur that originate a prohemosome associated to a mitochondrion, a phase that gives rise to a mature hemosome. The phenomenon of avian hemosome formation is similar to that of mammals.

5 — Spectrophotometric determinations in the lysed fraction supernatant, and the cytoplasmic hemoglobin were performed at 5.400 Å, demonstrating the presence of the heme group. By electrophoresis, hemoglobin was detected in the supernatant of the lysed hemosomic fractions of avian and mammalian embryos as well as in adult animals with hemolytic anemia, except in those animals with anemia induced by successive bleedings in which no hemoglobin was found through electrophoresis of the lysed fraction supernatant.

6 — The presence of hemoglobin in mammalian erythroblast nuclei, and avian erythroblasts, proerythrocytes and erythrocytes is not related with a blocking of synthesis; it is a consequence of the pressures of molecules that penetrate through the nuclear pores.

7 — In mammalian erythroblasts the total loss of chromatinic material occurs by extrusion, karyolysis or karyorrhexis, the level of hemoglobin synthesis continuing and even increasing in reticulocytes. In chickens, the blocking of hemoglobin synthesis seems to be related to the extrusion of a small

chromatin portion into the vesicles, parallel to the disaggregation from polysomic forms to monosomic forms.

8 — In chickens, vesicles which receive the chromatinic material originate from mitochondria fixed at the nuclear membrane and gradually lose their ultrastructural features. This phenomenon is concomitant to the cessation of hemoglobin synthesis.

9 — In successive-bleeding anemias of chickens and mammals, the results differ as to the period of time of the reaction in the erythropoietic tissue. In chickens, the interval between the beginning of the bleedings and the observation of the maximal reaction, confirmed by means of a proerythrocytosis in the peripheral blood, is of about 24 h, compared with the maximal reaction in mammals where the interval can be up to 72 h.

10 — As to the cytological aspect, the mechanism of hemoglobin synthesis is identical in adults with hemolytic anemia in recuperation phase, as well as in embryos. This similarity occurs in both chickens and mammals.

11 — Determination of the degree of the mammalian erythroblast maturation by the counting method of polysomes per area unit, taking as point of reference the orthochromatic phase, characterized by the eccentric nucleus, allows an evaluation of the maturation degree of avian erythron phases, where no characteristic morphological evidence is found as a point of reference for identification.

12 — The less immature avian forms, when stained according to Rosenfeld, may show some basophilia due to the presence of monomere forms originating from dissociated polysomes. Such forms must not be regarded as immature, considering the cessation of globin synthesis. For the cell in this maturation phase the term Proerythrocyte II is proposed. For the cells still containing polysomic forms, the term Proerythrocyte I is suggested.

13 — In chickens, in immature as well as in mature forms, microtubules were found to constitute the marginal band, as observed in hemolysed smears and ultrathin sections. In mammals, no microtubules were detected, except their remnants, constituents of the achromatic fuse.

Acknowledgements: The author wishes to express his thanks to Dr. A. Brunner Jr., Head of the Laboratory of Electron Microscopy of the Instituto Butantan, for valuable guidance, as well as to Drs. L.C. M. França, M. Velloni and J. Guidagli for their contribution is various phases of the cytopathologic work and to Drs. Arno Rudi Schwantes and Maria Luiza Barcellos Schwantes for performing the electrophoresis experiments. Thanks are also due to A. Silva Gonzales, H. Menezes and Vera Mondin Weisz for technical assistance and specially to Mrs. Sibylle Heller for editorial aid and translation. Finally, thanks to Mr. Heitor Costa and Mr. José do Nascimento for their collaboration in the illustrations.

COIRO, J.R.R. Comparative study on the ultrastructure of the elements of the avian and mammalian erythrocytic series. Correlation with hemoglobin biosynthesis.
Mem. Inst. Butantan, 39: 169-206, 1975.

RESUMO: Estudos ultra-estruturais de eritron de aves e mamíferos foram realizados no sangue periférico de embriões e de animais adultos normais ou anemizados, mediante o emprego de diferentes métodos, como a hemólise em esfregaço e cortes ultrafinos. Foram utilizados também a eletroforese em gel de poliacrilamida e a espectrofotometria, com a finalidade de detectar hemoglobina intrahemossomal, bem como a presença do grupo hemo nos sobrenadantes de lisados de diferentes frações. Estudou-se ainda a extrusão cromatínica nos eritrócitos maturos de aves, correlacionando-a com a extrusão do núcleo de eritroblastos ortocromáticos de mamíferos e comparou-se a gênese dos hemossomos em mamíferos e em aves. Também foi estudada a identidade da "Substantia granulo-filamentosa" (Sgf) de aves e mamíferos, bem como a avaliação do grau de maturação de células do erítron de aves, através de contagens de polissomos por μ^2. Por fim, verificou-se a existência de banda marginal, através de cortes ultrafinos e de esfregaços de sangue hemolisado.

Os resultados mostram que:

1. Nos esfregaços de sangue hemolisado ("Sgf") em aves, os filamentos de maior diâmetro são mitocôndrios e os de menor diâmetro são hemossomos.

2. Nas anemias por sangrias sucessivas, a "Sgf" é constituida quase que exclusivamente por mitocôndrios.

3. Os hemossomos das aves têm gênese idêntica à dos mamíferos e participam da biossíntese de hemoglobina.

4. A presença de hemoglobina intranuclear, não está relacionada ao bloqueio da síntese, o qual se relaciona com a extrusão cromatínica concomitante a uma desagregação polissômica.

5. Nas anemias por perda de sangue, as respostas do tecido hematopoiético em aves e mamíferos diferem no tempo de reação.

UNITERMOS: Ultra-estrutura do erítron em aves e mamíferos. Biossíntese de hemoglobina.

REFERENCES

1. ASTALDI, G., GALLO, V & INVERNIZZI, P. Valutazione quantitative degli asincronismi di maturazione nucleo-citoplasmica delle cellule midollari. I. Recherche sugli eritroblasti dell'anemia perniciosa prima e durante il trattamento. *Arch. Sci. Med., 90:* 502-505, 1950.

2. BERNHARD, W., BRAUNSTEINER, H. & MANGINI, H. Étude des réticulocytes au microscope électronique. *C. R. Soc. Biol*· (Paris), *143:* 1513, 1949.

3. BESSIS, M. Studies in electron microscpoy of blood cells. *Blood, 5:* 1083-1098, 1950.

4. BESSIS, M. Traité de cytilogie sanguine. Paris, Masson, 1954. p. 219.

5. BESSIS, M. Étude au microscope électronique de la destinée d'une molécule dans l'organisme. La ferritine et le cyclc hémoglobinique du fer. *Bull. Acad. nat. Méd.* (Paris), *142:* 629-643, 1958.

---

6. BESSIS, M. Cellules du sang normal et pathologique. Paris, Masson, 1972. p. 7, 179.

7. BESSIS, M. & BRETON-GORIUS, J. Incorporation de granules ferrugineux par les érythroblastes observée au microscope électronique. *C. R. Soc. Biol.* (Paris), *150:* 1903, 1956.

8. BESSIS, M. & BRICKA, M. Étude au microscope élétronique sur l'agglutination, la forme et la structure des globules rouges. *Rev. Hémat., 5:* 396-427, 1950.

9. BRAUNSTEINER, M. & BERNHARD, W. Reticulocyten und Innenkörper in Elektronenmikroskop. *Acta haemat.* (Basel), *3:* 167-170, 1950.

10. BRAUNSTEINER, H., FELLINGER, K. & PAKESCH, F. Über die Struktur der Reticulocyten. *Acta haemat.* (Basel), *16:* 322-328, 1956.

11. BRECHER, G. The structure of unstained reticulocytes. *Proc. Soc. exp. Biol., 69:* 89-90, 1948.

12. BROWN, D.D. & GURDON, J.B. Absense of Ribosomal RNA synthesis in the anucleolate mutant of *Xenopus laevis*. *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *51:* 139-146, 1964.

13. BRUNNER JR., A. A estrutura intrareticulocitária. *Mem. Inst. Butantan, 30:* 15-26, 1962.

14. BRUNNER JR., A. Maturação eritrocitária em roedores. (Tese — Universidade de São Paulo). São Paulo, 1968.

15. BRUNNER JR., A. Microtubules and microfilaments in immature erythrocytes. *Ciênc. Cult., 24:* 644-646, 1972.

16. BRUNNER JR., A. & COIRO, J.R.R. Fixation of erythrocytes in a glutaraldehyde gradient, followed by osmium tetroxide. *An. Acad. brasil. Ciênc., 45:* 679, 1973.

17. BRUNNER, JR., A., COIRO, J.R.R., MENEZES, H., MITSUTANI, C.Y. & CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. Vesicles carrying nuclear material in mature *Cyprinus carpio* erythrocytes. *Experientia* (Basel), *31:* 531-532, 1975.

18. BRUNNER JR., A., COIRO, J.R.R., SCHWANTES, M.L. & SCHWANTES, A.R. Hemosome and hemoglobin biosynthesis in embryos and in regressive anemias. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 335-344, 1973.

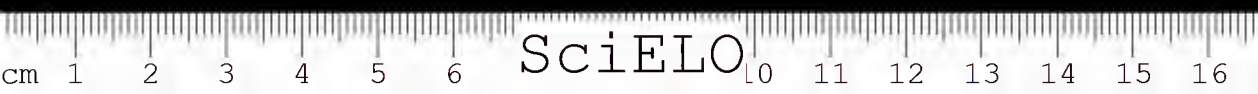
19. BRUNNER JR., A. & MOMBRUM, I.C. Genesis of mitochondrion-like organelles in reticulocytes of rabbit-embryos blood. *Ciênc. Cult., 25:* 448-451, 1972.

20. BRUNNER JR., A., SCHWANTES, A.R., SCHWANTES, M.L. & BEÇAK, W. Hemoglobin in immature erythrocytes mitochondrion-like organelles. *Experimentia* (Basel), *28:* 569-571, 1972.

21. BRUNNER JR., A. & VALLEJO-FREIRE, A. Electron microscopic observations on granules and filaments (Reticulosomes) of reticulocytes. *Exp. Cell Res., 10:* 55-62, 1956.

22. BRUNNER JR., A. & VALLEJO-FREIRE, A. Estruturas lamelares em reticulócitos. *Mem. Inst. Butantan, 31:* 9-14, 1964.

23. BRUNNER JR., A., VALLEJO-FREIRE, A. & SOUZA SANTOS, P. Electron microscopy of thin sections of reticulocytes. *Experientia* (Basel), *12:* 255, 1956.

24. BURKA, E.R. & MARKS, P.A. Ribosomes active in ribosomes disappearance during "in vivo" erythroid maturation. *Nature* (Lond.), *213:* 724-726, 1967.

---

25. BURT, B.A., MURRAY, R.G.E. & ROSSITER, R.J. Nucleic acids of rabbit reticulocytes. *Blood, 6:* 906-915, 1951.

26. CESARIS-DEMEL, A. Studien über die Roten Blutkörperchen mit den Methode der Färbung in Frishen Zustande. *Folia haemat.* (Lpz.), *4* (suppl. 1): 1-32, 1907.

27. COIRO, J.R.R. "Polylite 8001, T 213, 200 e 208 como meio de inclusão para microscopia eletrônica". Reunião Extraordinária da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. São Paulo, 1972.

28. COIRO, J.R.R. & BRUNNER JR., A. Polylite 8001: a new embedding medium for electron microscopy. *Rev. Microsc. Electr., 1:* 12, 1972.

29. COIRO, J.R.R. & BRUNNER JR., A. Behaviour of Polylite 8001 with plasticizing additives. *An. Acad. bras. Ciênc., 45:* 680, 1973.

30. COIRO, J.R.R., BRUNNER JR., A. & MITSUTANI, C.Y. A simple method for the observation on the marginal band in avian and chelonian erythrocytes. 1973 (submitted to appreciation).

31. COIRO, J.R.R., BRUNNER JR., A., SCHWANTES, M.L. & SCHWANTES, A.R. Hemoglobin in mitochondrion-like organelles of immature chick embryo erythrocytes. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 327-333, 1973.

32. COIRO, J.R.R., MENEZES, H., MITSUTANI, C.Y., CARVALHO DOS SANTOS, M.A.S. & BRUNNER JR., A. Chromatin extrusion in erythrocytes of *Gallus*, *Bothrops*, *Bufo* and *Cyprinus* species, and its significance. Congresso Latino Americano de Microscopia Eletrônica, 2.º. Resumos, *1:* 36. Ribeirão Preto (São Paulo), 1974.

33. COIRO, J.R.R., WEIGL, D.R., KISIELIUS, J., MENEZES, H. & BILLOTA, J.A.T. A new embedding medium (Polylite 8001) for biological material. *Ciênc. Cult., 24:* 660-662, 1972.

34. DAVIES, H.G. Structure in nucleated erythrocytes. *J. biophys. biochem. Cytol., 9:* 671-687, 1961.

35. DEHLER, A. Beiträge zur Kenntnis des feineren Banes der Roten Blutkör perchen beim Hühnerembryo. *Arch. mikr. Anat., 46:* 414-430, 1895.

36. DERVICHIAN, D.G., FOURNET, G. & GUINIER, A. Mise en evidence d'une structure submicroscopique dans les globules rouges par la diffusion des rayon X aux petites angles. *C.R. Acad. Sci.* (Paris), *224:* 1848-1850, 1947.

37. DIETZ, A.A. & LUBRANO, T. Separation and quantitation of lactic dehydrogenase isoenzymes by disc electrophoresis. *Analyt. Biochem., 20:* 246-257, 1967.

38. DINTZIS, H., BORSOOK, H. & VINOGRAD, J. Microsome particles in protein synthesis. New York, Pergamon, 1958, p. 95.

39. DUSTIN JR., P. Ribonucleic acid and vital staining of cytoplasmic vacuoles in animal cells. *In:* Symposia Society Experimental Biology. Nucleid Acids. Cambridge, University Press, 1947. v. 1, p. 114.

40. EDSTRÖM, J.E. & DANEHOLT, B. Sedimentation properties of the moly synthesized RNA from isolated nuclear components of *Chironomus tentans* salivary gland cells. *J. molec. Biol., 28:* 331-343, 1967.

41. FANTONI, A., DE LA CHAPELLE, A., RIFKIND, R.A. & MARKS, P.A. Erythroid cell development in fetal mice: synthetic capacity for different proteins. *J. molec. Biol., 33:* 79-91, 1968.

42. FAWCETT, D.W. Electron microscopic observations on the marginal band of nucleated erythrocytes. *Anat. Rec., 133:* 379-380, 1959.

---

43. FAWCETT, D.W. & WITEBSKY, F. Observation on the ultrastructure of nucleated erythrocytes and thrombocytes, with particular reference to the structural basis of their discoidal shape. *Z. Zellforsch., 62:* 782-806, 1964.

44. FURCHGOTT, R.F. & PONDER, E. Disk-sfere transformation in mammalian red cells. II. The nature of the antisphering factor. *J. exp. Biol., 17:* 117-127, 1940.

45. GLOWACKI, E.R. & MILLETTE, R.L. Polyribosomes and loss of hemoglobin synthesis in the maturing reticulocyte. *J. molec. Biol., 11:* 116-127, 1965.

46. GRASSO, J.A. Cytoplasmic microtubules in mammalian erythropoietic cells. *Anat. Rec., 156:* 397-414, 1966.

47. GRASSO, A., SWIFT, H. & ACKERMAN, G.A. Observations on the development of erythrocytes in mammalian fetal liver. *J. Cell Biol., 14:* 235-254, 1962.

48. HAMMEL, C.L., RASMUSSEN, P. & BESSMAN, S.P. Hemoglobin synthesis. A nuclear function in the avian erythrocyte. *J. Cell Biol.* (Abstract), *19:* 31A, 1963.

49. HUG, O., LIPPERT, W. & MOSER, P. Comp. Red. 1st Congress Inter. Microsc. Electron. 672, 1950. Cited by LOWENSTEIN, L.M. The mammalian reticulocyte. *In: Int. Rev. Cytol., 8:* 141, 1959.

50. IZAWA, M. & KAWASHIMA, K. RNA synthesis in the nucleoli of mouse ascites tumor cells in relation to nucleolar components. *Biochim, biophys. Acta* (Amst.), *155:* 51-62, 1968.

51. JACOB, F. & MONOD, J. Genetic regulatory mechanism in the synthesis of proteins. *J. molec. Biol., 3:* 318-356, 1961.

52. JENSEN, W.N., ASHENBRUKER, H., CARTWRIGHT, G.E. & WINTROBE, M.M. The uptake in vitro of radioative iron by avian erythrocytes. *J. Lab. clin. Med., 42:* 833-846, 1953.

53. JONES, O.P. Elimination of midbodies from mitotic erythroblasts and their contribution to fetal blood plasma. *J. nat. Cancer Inst., 42:* 753-763, 1969.

54. JUNG, F. *Folia haemat.* (Lpz), *7:* 258-259, 1956. *In:* LOWENSTEIN, L.M. The mammalian reticulocyte. *Int. Rev. Cytol., 8:* 142, 1959.

55. KAMPEN, E.J.V. & ZIJLSTRA, W.G. Erythrocytometric methods and their standardization. Basel, Boroviczény & Karger, 1964. v. 18, p. 68.

56. KELLEMBERGER, E., RYTER, A. & SÉCHAUD, J. Electron microscope study of DNA containing plasma. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. biophys. biochem. Cytol., 4:* 671-676, 1958.

57. KOSENOV, H. Ueber den Strukturwan, der Basophilen Subsatnz Junger Erythrocyten in Fluoreszensmikroskop. *Acta haemat.* (Basel), *7:* 360-368, 1952.

58. LABBE, R.F. & HUBBARD, N. Metal specificity of the iron protoporphyrin chelating enzime from rat liver. *Biochim. biophys. Acta, 52:* 130-135, 1961.

59. LEONARDI, P. Valutazione e significato delle picnosi dei nuclei eritroblastici midollari in condizioni mormali. *Haematologica, 35:* 409-427, 1951.

60. LEWIS, W.H. Pynocytosis. *Bull. Johns Hopk. Hosp., 49:* 17-27, 1931.

61. LISON, L. Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes. Paris, Gauthier-Villars, 1953, v. 1, p. 475-480.

62. MARKS, P.A., RIFKIND, R. & DANON, D. Polyribosomes and proteins synthesis during reticulocyte maturation "in vitro". *Proc. nat. Acad. Sci.* (Wash.), *50:* 336-342, 1963.

63. MATHIAS, A.P., WILLIANSON, R., HUXLEY, H.E. & PAGE, S. Occurrence and function of polysome in rabbit reticulocytes. *J. molec. Biol., 9:* 154-167, 1964.

64. MENEZES, H., COIRO, J.R.R. & BRUNNER JR., A. Vesículas Feulgen positivas de *Bufo*, *Gallus* e *Liophis*. Reunião Extraordinária da Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica. São Paulo, 1972.

65. MEVES, F. Gesammelte Studien an roten Blutkörperchen der Amphibien. *Arch. mikr. Anat., 77:* 465-540, 1903.

66. MOORE, C.V. & BROWN, E.B. Progresos en Hematologia. Barcelona, Editorial Cientifico-Medica, 1968. v. 2.

67. NICHOLAS, A. Sur quelques particularités de structure des erythrocytes nuclées après coloration par d'hematoxyline ferrique. *Bibl. Anat.* (Basel), *4:* 16-20, 1896.

68. O'BRIEN, B.R.T. The presence of haemoglobin withim the nucleus of the embryonic chick erythroblasts. *Exp. Cell Res., 21:* 226-228, 1960.

69. ORLIC, D., GORDON, A.S. & RHODIN, J.A.G. An ultrastructural study of erythropoietin — induced red cell formation in mouse spleen. *J. Ultrastruct. Res., 13:* 516-542, 1965.

70. PARKS, H.F. & CHIQUOINE, A.D. Observations on early stages of phagocytosis of colloidal particles by hepatic phagocytes of the mouse. *In:* Proceedings of the Stockholm Conference Electron Microscopy. Uppsala, Almquist & Wiksells, 1957. p. 154.

71. PAULING, L., ITANO, H.A., SINYER, J. & WELLS, I.C. Sickle cell anemia, a molecular disease. *Science, 110:* 543-548, 1949.

72. PENMAN,, S., SMITH, I. & HOLZMAN, E. Ribosomal RNA synthesis and processing in a particulate site in the HeLa cell nucleus. *Science, 154:* 786-789, 1966.

73. PERUTZ, M.F. Submicroscopic structure of the red cell. *Nature, 161:* 204-205, 1948.

74. PETERS, D. & WIGAND, R. Elektronenmikroskopishe Untersuchung der Struktur Hämolisierter Reticulocyten. *Klin. Wochschr., 28*: 37-38, 1950.

75. PINHEIRO, P., LEBLOND, C.P. & DROZ, B. Synthetic capacity of reticulocytes as shown by radioautography after incubation with labeled precursors of protein or RNA. *Exp. Cell Res., 31:* 517-537, 1963.

76. POLICARD, A., BESSIS, M. & BRETON-GORIUS, J. Structures myéliniques observées au microscope électronique sur des coupes de globules rouges em voic de lyse. *Exp. Cell Res., 13:* 184-186, 1957.

77. PONDER, E. Hemolysis and related phenomena. New York, Grune & Stratton, 1948, v.I.

78. PORRA, R.J. & JONES, O.T.G. An investigation of the role of ferrochelatase in the biosynthesis of various haem prosthetic groups. *Biochem. J., 87:* 186-192, 1963.

79. PORTER, K.R. Observations on a submicroscopic basophilic component of cytoplasm. *J. exp. Med., 97:* 727-750, 1953.

80. RANVIER, L. Récherches sur les élements du sang. *Arch. Physiol., 2:* 1-15, 1875.

81. REIMANN, F. Retikuläre Substanz und Haemoglobinbildung. *Schweiz. Z. Path., 5:* 343-352, 1942.

---

82. REYNOLDS, E.S. The use of lead citrate of high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol., 17:* 209, 1963.

83. RIFKIND, R.A., DANON, D. & MARKS, P.A. Alterations in polyribosomes during erythroid cell maturation. *J. Cell Biol., 22:* 599-611, 1964.

84. ROSENFELD, G. Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova combinação dos componentes do May-Grünwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan, 20:* 329-334, 1947.

85. SANO, S. Studies on the nature of basophilic stippled cell in lead poisoning. Report. 2. Studies on the mechanism of granule formation of basophilic stippled cell in lead poisoning. *Acta haemat. Jap., 18:* 631-635, 1955.

86. SCHULTZ, H. & DE PAOLA, S.D. Delta-Cytomembranem und Lameläre Cytosomen. *Z. Zellforsch., 49:* 125-141, 1958.

87. SENO, S. The structure and the function of reticulocyte. *Acta haemat. Jap., 21:* 171-181, 1958.

88. SENO, S., MIYAHARA, M., OCHI, O., MATSUOKA, K., TOYAMA, Y. & SHIBATA, T. Does reticulocyte synthesize RNA? *Acta med. Okayama, 17:* 253-256, 1963.

89. SEYFARTH, C. Experimentelle und klinische Untersuchungen über die vitalfärbbaren Erythrozyten. *Folia haemat.* (Lpz), *34:* 7-38, 1927.

90. SIMMEL, H. Untersuchungen an jungen Erythrozyten (Studies on young erythrocytes). *Folia haemat.* (Lpz), *32:* 97-102, 1926.

91. SIMPSON, C.F. & KLING, J.M. The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *J. Cell Biol., 35:* 237-245, 1967.

92. THOMA, K. *Klin. Wochschr.*, 28: 215-216. 1950. *In*: LOWENSTEIN, L.M. The mammalian reticulocyte. *Int. Rev. Cytol., 8:* 141, 1959.

93. THORELL, B. Relation entre les modifications cytochimiques et citologiques au cours de l'erythropoiese. *Rev. Hémat., 5:* 561-564, 1950.

94. TOOZE, J. & DAVIES, H.G. The occurrence and possible significance of haemoglobin in the chromosomal regions of mature erythrocyte nuclei of the newt *Triturus cristatus crisattus. J. Cell Biol., 16:* 501-511, 1963.

95. VALLEJO- FREIRE, A. & BRUNNER JR., A. Eritrócitos na reticulocitose do saturnismo experimental. Estrutura mitocondrial. *Mem. Inst. Butantan, 28:* 245-266, 1958.

96. WARNER, J.R., RICH, A. & HALL, O.E. Electron microscope studies of ribosomal clusters synthesizing hemoglobin. *Science, 138:* 1399-1404, 1962.

97. WEIDENREICH, F. Studien über das Blut die blutbildungen und-zerstörenden Organe. III Über den Bau der Amphibien-erythrocyten. *Arch. mikr. Anat., 66:* 270-298, 1905.

98. WEINBACH, E.C. A procedure for isolating stable mitochondria from rat liver and kidney. *Analyt. Biochem., 2:* 335-343, 1961.

99. WILT, F.H. The ontogeny of chick embryo hemoglobin. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.), 48:* 1582-1590, 1962.

100. WOLPERS, C. Elektronemikrospiche Untersuchungen der Innenstrukturem Kernloser Erythrocyten. I. Reticulocyten und Pseudoreticulocyten. *Klin. Wischr., 34:* 61-69, 1956.

Recebido para publicação em 16-IV-1975 e aceito em 9-VI-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 207-215, 1975

IMPORTÂNCIA DA CONSTITUIÇÃO ANATÔMICA DA PONTA DO VENTRÍCULO ESQUERDO NA PATOLOGIA DESSA REGIÃO NAS MIOCARDIOPATIAS NO BRASIL.*

MÉRCIA A.C. BARTKEVITCH, HELENA MÜLLER e
CARLOS MARIGO
Departamento de Patologia, Faculdade de Ciências Médicas da
Santa Casa de São Paulo

RESUMO: A grande incidência de processos patológicos (adelgaçamento, aneurisma, fibrose e ou trombose mural) da ponta do ventrículo esquerdo do coração nas miocardiopatias em nosso meio, consideradas mesmo por alguns autores como patognomônicos da moléstia de Chagas, levou-nos a estudar a morfologia dessa região em corações normais, comparativamente com outros patológicos. Verificou-se sistematicamente (em corações normais) que a espessura da ponta é mais fina, quando comparada com a espessura do restante da parede do ventrículo esquerdo, fato este que se acentua com a idade, variando de 1:2 até 1:22. Muitas vezes a morfologia normal dessa região é representada apenas por uma fenda, limitada pelo endocárdio e pericárdio, com escassa musculatura. O objetivo deste trabalho é o de demonstrar a existência desse fator constitucional como predisponente à alta incidência da patologia acima citada, aí localizada, principalmente quando esse escasso miocárdio é lesado.

UNITERMOS: Miocardites. Moléstia de Chagas.

INTRODUÇÃO

A grande ocorrência de processos patológicos na ponta do ventrículo esquerdo, em nosso meio, processos esses caracterizados principalmente por adelgaçamento, aneurisma, fibrose e ou trombose mural (Fig. 1), relatados comumente na Moléstia de Chagas [1, 6, 10, 11, 12, 13], levou-nos a verificar qual a incidência dessas alterações no material da Santa Casa de São Paulo e suas

---

* Parte deste trabalho foi apresentado no VIII Congresso da Sociedade Brasileira de Patologia — Julho de 1968 — Ribeirão Preto, SP.

Endereço para correspondência: Faculdade de Medicina de Catanduva. Catanduva, São Paulo, Brasil.

possíveis relações com as miocardiopatias em geral, não chagásicas, uma vez que nosso hospital recebe pacientes das mais diversas regiões do país. Tendo em vista a noção existente em nosso Departamento, de que a morfologia da ponta dos corações normais predispõe a esse tipo de patologia [9] fizemos o estudo da anatomia normal dessa região.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos para este trabalho material de 1222 necrópsias de rotina, sendo 600 de adultos e 622 de crianças, da Santa Casa de São Paulo, Departamento de Patologia, cujas idades variaram desde recém-nascidos de 1 dia até adultos de 70 anos, de ambos os sexos e de diversas raças. Para o estudo da morfologia normal da ponta foram escolhidos casos sem patologia cardíaca de qualquer natureza e selecionados 100 casos, que tinham sido cortados rigorosamente de acordo com o método utilizado. Fizemos também o levantamento dos casos com processos patológicos do miocárdio, utilizando cerca de 4.000 necrópsias consecutivas e anotando aqueles com alterações da ponta do ventrículo esquerdo, os quais totalizarm 112 casos (Tab. 1).

TABELA 1

Patologia da ponta do coração — 112 casos de Miocardiopatias

Doenças	Número de Casos	Com Patologia da Ponta	Porcentagem
Miocardite chagásica	50	32	64%
Miocardite reumática	27	0	—
Miocardites de etiologia não esclarecida*	20	10	50%
Miocardiosclerose	15	3	20%

Dep. Patologia Santa Casa S.P.

Os corações foram examinados da seguinte maneira: realizamos um corte frontal no coração compreendendo ambos os ventrículos e septo, para metodizar as mensurações. Estas foram feitas ao nível do terço médio da parede lateral do ventrículo esquerdo, e na ponta, usando-se lupa manual e régua milimétrica. Os corações foram previamente lavados com água, no sentido da corrente sanguínea para remover o sangue e fixados em formol a 10% por 24 - 48 horas. Toda a amostra foi examinada também em cortes histológicos corados pelo HE e tricrômico de Masson.

* Miocardites intersticiais provavelmente a virus e alguns casos provavelmente chagásicos, não confirmados.

Fig. 1 - Aspecto macroscópico do ventrículo esquerdo na miocardite chagásica com a chamada "lesão da ponta".

BARTKEVITCH, M. A. C.; MÜLLER, H. & MARIGO, C. Importância da constituição anatômica da ponta do ventrículo esquerdo na patologia dessa região nas miocardiopatias no Brasil.
Mem. Inst. Butantan, 39: 207-215, 1975.

RESULTADOS

Verificamos em nosso estudo de corações normais que a parede da ponta é sistematicamente fina, fato esse que mais se evidencia, se relacionado com a espessura da parede do ventrículo esquerdo. Esta relação variou de 1:2 até 1:22 aumentando progressivamente com a idade (Tab. 2).

TABELA 2

Alguns exemplos em vários grupos etários, mostrando a relação das espessuras da parede do ventrículo esquerdo e sua ponta em corações normais

N.º Autópsia	Idade	Sexo	Cor	Ponta-V.E. cm	Parede-V.E. cm	Relação Parede/Ponta
12.927	1d	M	M	0.2	0.1	1:2
12.429	13d	M	B	0.1	0.3	1:3
12.506	2m	F	B	0.2	0.4	1:2
12.496	3m	M	M	0.2	0.5	1:2,5
12.730	4m	M	M	0.4	0.6	1:1,5
12.710	7m	M	M	0.3	0.7	1:2,3
12.509	11m	M	M	0.1	0.5	1:5
12.766	3 a 1m	M	B	0.3	0.7	1:2,3
13.676	10a	M	M	0.3	1.2	1:4
12.715	11 a 6m	M	B	0.3	1.3	1:4
14.034	15a	M	B	0.2	1.3	1:6,5
12.454	20a	M	M	0.5	1.5	1:3
14.152	25a	M	M	0.2	1.8	1:9
13.996	36a	M	B	0.5	2	1:4
9.296	40a	F	B	0.1	2	1:20
12.720	41a	M	B	0.2	1.2	1:6
13.829	52a	M	M	0.2	2	1:10
13.030	54a	F	M	0.1	2.2	1:22

d = dia　a = ano　P = preto　Dep. Pat. Santa Casa S.P.
m = meses　B = branco　M = mulato

Os dados obtidos revelam que o aumento da espessura da parede lateral do ventrículo esquerdo com a idade, não é acompanhado nas mesmas proporções, pela parede da ponta, existindo um verdadeiro índice de adelgaçamento dado pela relação espessura da ponta/espessura da parede do ventrículo esquerdo. Temos alguns exemplos dessa morfologia em corações normais nas figuras 2 a 6.

Foram também revistos 112 casos de cardiopatias com lesões miocárdicas, das quais 45 apresentavam as lesões de ponta já referidas anteriormente. A incidência das mesmas em relação com a patologia do miocárdio é vista na Tabela 1. Como se verifica a patologia da ponta ocorre não só na Moléstia de Chagas, como é frequentemente referida na literatura, mas em outras enti-

BARTKEVITCH, M. A. C.; MÜLLER, H. & MARIGO, C. Importância da constituição anatômica da ponta do ventrículo esquerdo na patologia dessa região nas miocardiopatias no Brasil.
Mem. Inst. Butantan, *39*: 207-215, 1975.

Fig. 2 - Coração de criança, 13 dias, masc., br.. Relação parede/ponta do V.E. = 1:3.

Fig. 3 - Coração de criança, onze meses, masc., pardo. Relação parede/ponta do V.E. = 1:5.

Fig. 4 - Coração de criança, vinte e um meses, fem., pardo. Relação parede/ponta do V.E. = = 1:12. Notar a ponta limitada apenas pelo epicárdio.

Fig. 5 - Quinze anos, masc., br.. Relação parede/ponta do V.E. = 1:6,5.

dades mórbidas de nosso meio como miocardites intersticiais a vírus, miocardioesclerose, etc. (Tab. 1).

COMENTÁRIOS

A morfologia dessa região cardíaca, no que diz respeito à sua espessura, não é referida nos tratados de Anatomia e sequer mencionada nos compêndios de cirurgia cardiaca por nós consultados [2, 3, 4, 5, 8, 17, 18, 19, 20], bem como em publicações especializadas ou comunicações prévias [7, 14, 15, 16]. Fato digno de nota é que, na maioria dos casos, a ponta do ventrículo esquerdo é representada apenas por uma fenda, delimitada pelo epicárdio, endocárdio e com escassos feixes musculares, entremeados e descontínuos (Fig. 7).

Os nossos achados fazem supor que a espessura da ponta ao contrário do restante da parede do ventrículo esquerdo não acompanha o completo desenvolvimento do órgão, representando não uma anomalia, mas um fator de variação constitucional anatômico.

É óbvio portanto, que nas cardiopatias em que as fibras musculares propriamente ditas estão comprometidas ou substituídas por fibrose, a incidência de alterações anatomo-patológicas neste "locus minoris resistentiae" aumente, como realmente demonstra nosso material de miocardites. A menor ocorrência de lesões de ponta na miocardite reumatismal poderia ser explicada exatamente pelo não comprometimento das fibras miocárdicas e sim somente no tecido peri-vascular (nódulos de Aschoff e suas sequelas). Acreditamos que em casos de intensa miocardite reumatismal possa haver uma incidência pouco maior de patologia da ponta do que a vista na Tabela 1, mesmo porque estes corações foram abertos pelo método normalmente utilizado pelos patologistas (obedecendo o sentido da corrente sanguínea), para melhor estudo das válvulas e dessa maneira nem sempre é possível evidenciar nitidamente as diferenças de espessura da parede lateral e ponta do ventrículo esquerdo.

Com este trabalho de observação de material de rotina, julgamos contribuir para a melhor compreensão da patologia da ponta do coração nas miocardiopatias em geral, particularmente no nosso meio, quase sempre atribuídas a uma só entidade mórbida e para a qual vários mecanismos patogênicos são aventados, [1, 6, 10, 12, 13].

CONCLUSÕES

1 — Existe um fator constitucional anatômico predisponente para a alta incidência de alterações da ponta do ventrículo esquerdo do coração nas miocardiopatias, inflamatórias ou não. Esse fator anatômico é representado por uma parede delgada e pobre em fibras musculares.

2 — A "lesão da ponta" não é patognomônica da Moléstia de Chagas, mas apenas mais frequente nesta entidade mórbida.

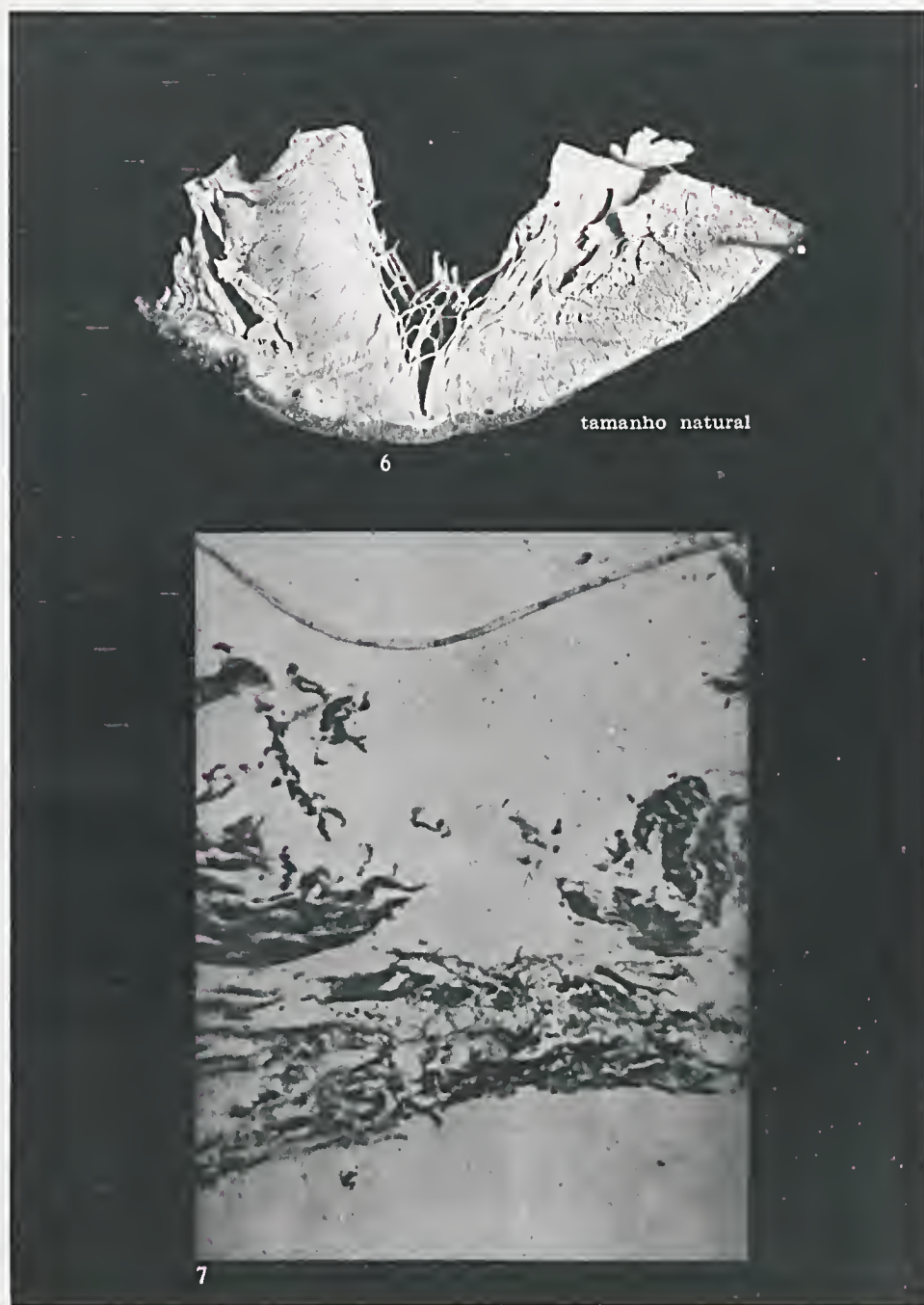



Fig. 6 - Quarenta anos, fem., br.. Relação parede/ponta do V.E. = 1:20.

Fig. 7 - Ponta do coração: corte histológico, corado pelo tricrômico de Masson. Aumento 6,3 x. Notar a ponta do V.E. representada apenas pelo epicárdio e escassos feixes musculares descontínuos.

BARTKEVITCH, M. A. C.; MÜLLER, H. & MARIGO, C. Importância da constituição anatômica da ponta do ventriculo esquerdo na patologia dessa região nas miocardiopatias no Brasil.
Mem. Inst. Butantan, 39: 207-215, 1975.

ABSTRACT: In view of the high incidence of pathological processes in the tip of the heart, in myocardiopathies found in Brazil, a study of the morphology of this region has been undertaken. Normal hearts have been studied and compared with pathological hearts. The normal hearts were obtained from 1220 necropsies of individuals ranging in age from 1 day to 70 years. The heart tip was systematically thinner when compared with the remainder of the left ventricle wall. Thinness increase with age. The relationship between the findings and several pathological processes (thinness of the wall tip, aneurism, fibrosis and mural thrombosis), as well as Chagas' disease and other myocardiopathies in Brazil was discussed. The authors draw special attention to the meaning of the *anatomic constitutional factor as predisponent to the several pathologies studied.*

UNITERMS: Myocarditis. Chagas' disease.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, Z. A lesão apical do coração na miocardite crônica chagásica. *Hospital, 50:* 59-72, 1956.
2. BAILEY, C. P. Surgery of the Heart - Ventricular Septal defects. Philadelphia, Febeger, 1955.
3. FARINA, A. Atlante de Anatomia Humana Discrittiva. Milano, Ricordati, 1957.
4. GARDNER, E. Anatomia - Estudo Regional do Corpo Humano. 2.ª ed. Rio de Janeiro, Koogan, 1967.
5. HOLLINSHEAD, W. H. Text book of Anatomy. 2.ª ed. New York, Harper & Row, 1967.
6. KOBERLE, F.; BRITO COSTA, R. de; MELLO DE OLIVEIRA, J. A. & OLIVEIRA, J. S. Patologia da moléstia de Chagas - Medicina. *Rev. C. A. Rocha Lima e Hosp. Clinicas - Fac. Med. Ribeirão Preto*, 1: 5-45, 1972.
7. LEV, M. & SIMKINS, C. S. Architecture of the human ventricular myocardium. *Amer. Heart J., 5:* 397-409, 1956.
8. LOCKHART, R. D.; HAMILTON, G. F.; FYFE, F. W. Anatomia Humana. México, Editorial Interamericana S. A., 1965.
9. MAFFEI, W. E. Fundamentos da Medicina. São Paulo, Procienx, 1968. v. II.
10. MELLO DE OLIVEIRA, J. A. Patogenia do aneurisma da ponta na cardiopatia chagásica. Ribeirão Preto, 1967 (Tese - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto).
11. MIGNONI, C. Alguns aspectos da anatomia patológica da cardite chagásica crônica. São Paulo, 1958 (Tese - Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo).
12. MOIA, B.; ROSENBAUN, M. B. & HOYMAN, D. Aneurysmas ventriculares en la miocarditis crônica chagásica. *Rev. argent. Cardiol., 22:* 113-115, 1955.
13. RASO, P. Contribuição ao estudo da lesão vorticilar na cardite chagásica crônica. Belo Horizonte, 1964 (Tese - Faculdade dc Medicina de Belo Horizonte.

BARTKEVITCH, M. A. C.; MÜLLER, H. & MARIGO, C. Importância da constituição anatômica da ponta do ventrículo esquerdo na patologia dessa região nas miocardiopatias no Brasil.
Mem. Inst. Butantan, 39: 207-215, 1975.

14. RASO, P. Variações antômicas do vórtex do coração em crianças. Congresso Brasileiro de Patologia, VII. Ribeirão Preto, 1968.

15. ROBB, J. S. & ROBB, R. C. Abnormal distribution of the superficial muscle bundles in the human heart. *Amer. Heart J., 15:* 597-603, 1938.

16. ROBB, J. S. & ROBB, R. C. The normal heart - Anatomy and physiology of the structural units. *Amer. Heart J., 23:* 455-467, 1942.

17. ROUVIERE, H. Anatomia Humana Descritiva y Topográfica. 6.ª ed. Paris, Masson, 1948.

18. SPALTEHOLZ, W. Atlas de Anatomia Humana. 3.ª ed. Barcelona, Labor, 1967.

19. TESTUT, L. & LATARGET, A. Tratado de Anatomia. 9.ª ed. Barcelona, Salvat, 1968.

20. TANDLER, J. Tratado de Anatomia Sistemática. Barcelona, Salvat, 1929.

Recebido para publicação em 30-V-1975 e aceito em 28-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 217-223, 1975

RELATO E CONSIDERAÇÕES SOBRE A PRESENÇA DE CÉLULAS DE WARTHIN-FINKELDEY EM PACIENTE PORTADOR DE MOLÉSTIA DE HODGKIN EM ATIVIDADE. *

JESUS CARLOS MACHADO e LEONOR DENARO
Secção de Anatomia Patológica, Instituto Butantan

RESUMO: A Célula de Warthin-Finkeldey presente nos tecidos linfóides de pacientes portadores de Sarampo, é tida como específica dessa entidade nosológica. Aparecendo nos tecidos linfóides na fase pré-exantemática, segundo numerosos autores, permite não só o diagnóstico anátomo-patológico dessa entidade como também até prever com antecipação o surgimento do surto exantemático. Os autores do presente trabalho apresentam caso de paciente portador de Moléstia de Hodgkin no qual a retirada de um gânglio linfático cervical, mostrou nessa estrutura numerosas células de Warthin-Finkeldey, sem a ocorrência no paciente de qualquer manifestação clínica de sarampo. Também nenhuma outra criança da Enfermaria Infantil onde estava o paciente apresentou a sintomatologia do sarampo. Analisam as possíveis interpretações desse achado.

UNITERMOS: Moléstia de Hodgkin. Sarampo. Virologia.

INTRODUÇÃO

A histopatologia da Moléstia de Hodgkin e os aspectos peculiares imunopatológicos que a acompanham têm sido objeto de grande estudo e avanço nesses últimos dez anos. A etiopatogenia apesar disso tem-se constituído ainda em uma grande incógnita. Desta forma a apresentação de certos quadros patológicos intercorrentes, merecem, a nosso ver, relatos especiais para que possíveis ilações etiopatogenéticas ou outras possam ser mais convenientemente analisadas. Assim achamos oportuno relatar o encontro de células de Warthin-Finkeldey, tidas como patognomônicas do quadro anátomo-patológico do Sa-

---

* Trabalho realizado em colaboração com o Instituto Central - Hospital A. C. Camargo - Fundação Antonio Prudente e com auxilio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan (FEDIB). Apresentado no Congresso de Anatomia Patológica da Soc. Bras. de Patologistas, realizado em Curitiba (PR) em 1974.
Endereço para correspondência: Caixa postal 65 - São Paulo - Brasil

rampo, em gânglio linfático cervical de um menor, portador da Moléstia de Hodgkin. Ainda mais que, nêle não se observou, o quadro clínico do sarampo. Esses achados, quais sejam, a concomitância da Moléstia de Hodgkin com a célula de Warthin-Finkeldey e a ausência do quadro clínico do sarampo justificam, a nosso ver, amplamente este relato.

O quadro anátomo-patológico do sarampo, está bem estabelecido, e segundo Roberts e Bain [5] (1958), foi inicialmente descrito por Ciaccio (1910) e Alagna (1911), que mostraram alterações nos folículos linfóides onde encontraram células gigantes multi-nucleadas e com grande massa de cromatina, lembrando segundo eles, megacariocitos. Foram Warthin [6] (1931) e Finkeldey [2] (1931) que descreveram o quadro anátomo-patológico típico do sarampo em amigdalas e no apêndice de crianças com a célula típica que levou os seus nomes. Trata-se de uma célula gigante com grande riqueza de núcleos dispostos por vezes em cachos de uva ou moruliformes. Hathaway (1935) mostrou que esses elementos eram difusos pelo organismo. A presença dessas células gigantes no tecido linfóide precedia a fase exantemática.

Células gigantes epiteliais também foram descritas no sarampo, como no epitélio dos brônquios por Hecht (1910), segundo Roberts e Bain [5] (1958). Mas, estas podem ser encontradas em afecções que não o sarampo, constituindo o chamado quadro das pneumonias de células gigantes. Também nos alvéolos elas foram descritas e sobre isso Janigan [3] (1961) publica extensa lista de autores que as observaram.

Ao que saibamos não há relato na literatura médica especializada da presença de células de Warthin-Finkeldey associadas a outras afecções, que não o sarampo.

MATERIAL

Tratava-se de uma criança do sexo masculino, de cor branca — caucasiano — com 7 anos de idade, originário de Pouso Alegre, Minas Gerais. Apresentava volumosas massas tumorais nas regiões cervicais e inguinais, identificadas também claramente pela Linfografia. O quadro clínico completava-se com surtos febris intermitentes após os quais os gânglios aparentemente diminuiam de volume, sem desaparecer. Em Campinas foi feito o diagnóstico histológico, pela Faculdade de Medicina, Serviço de Anatomia Patológica do Prof. Dr. J. Lopes de Faria, de Moléstia de Hodgkin. Com êsse diagnóstico foi enviado ao Hospital de Cancer de S. Paulo. Nele foi realizada outra biópsia cujo gânglio linfático mostrou o quadro anátomo-patológico que iremos descrever. O gânglio linfático bem aumentado de volume (3 x 3 x 2,5 cm), mostrava macroscopicamente cápsula distendida, de cor branca e consistência elástica. Ao corte, observava-se que não havia delimitação da cortical com a medular, sendo todo ele ocupado por tecido brancacento uniforme. Os cortes histológicos mostraram forte proliferação linfática, tanto na zona correspondente à cortical como na medular. Desde logo destavam-se elementos linfocitóides que se agrupavam dando idéia de "aglutinação nuclear", constituindo pequenos conglomerados. O escasso citoplasma na maioria era acidofílico. Os núcleos se

aglomeravam com variada morfologia, ora alongados, ora como "cachos de uva" ora moruliformes, dispondo-se nos cordões medulares, na cortical, na região inter-folicular ou dispostos peri-vascularmente. Os núcleos são linfocitóides e não histiocitóides como os encontrados nas outras células gigantes sendo também facilmente distinguíveis de megacariocitos. Processos degenerativos dessas células gigantes são encontrados, chamando atenção raras inclusões intranucleares basofílicas. Fenômenos de cariorexis são comuns. Eosinfilia e plasmacélulas não são frequentes. A célula gigante (Figs. 1 a 4) é facilmente identificável como aquela descrita por Warthin e Finkeldey no sarampo.

DISCUSSÃO

A célula gigante de Warthin-Finkeldey, com as características descritas, quais sejam a de possuir grande número de núcleos de tipo linfocitário, contido em citoplasma não muito abundante acidofílico e raramente basofílico, com os núcleos aglutinados e dispostos como em "cachos de uva" ou moruliformes, superpostos e dispersos irregularmente pela estrutura lnfocitária que a alberga, é segundo M. Matumoto [4] (1959) e outros autores, patognomônica para o sarampo, a exemplo do que seria a célula de Sternberg para a Moléstia de Hodgkin. Segundo Haas, o tamanho da célula e o número de núcleos é proporcional a intensidade da multiplicação vírica. Também G.B.S. Roberts e A.D. Bain [5] (1958) afirmam que o desenvolvimento dessas células gigantes multi-nucleadas no tecido linfóide do organismo, no sarampo, é ocorrência constante. Trata-se, segundo esses autores, de resposta específica do tecido linfóide à presença do vírus, apesar deles não terem sido ainda nelas identificados. Essas células aparecem 7 dias antes do exantema e desaparecem após este ter-se manifestado. O mecanismo de formação dessas células gigantes, segundo Roberts e Bain [5] (1958) Aoyama [1] (1959) e Matumoto [4] (1966), no sarampo e outros mixovírus está esclarecido. Forma-se a partir da fusão das membranas periféricas de cada uma das células. O fator que dissolve as paredes celulares é idêntico ao que produz a atividade hemolítica do vírus do sarampo ou ao menos encontra-se ligado às mesmas estruturas lipo-proteicas do vírus.

Assim, não padece dúvida, do encontrado na literatura, que a célula de Warthin-Finkeldey é patognomônica do sarampo, aparecendo na fase pródrômica pré-exantemática e desaparecendo com o surgir deste. Não encontramos na literatura médica especializada referência do encontro dessa célula em outras afecções e mesmo os livros textos de patologia, mais usuais, ignoram habitualmente esta célula. Foi, com surpresa que, ao diagnosticarmos este quadro histopatológico, não observássemos o quadro clínico posterior exantemático típico do sarampo no paciente. Diante do não encontro do quadro anátomo-patológico da moléstia de Hodgkin, solicitamos à Faculdade de Medicina de Campinas as lâminas do caso e na revisão efetuada, comprovamos a existência desta afecção no primeiro gânglio retirado. A sub-tipagem, a nosso ver, enquadrou a Moléstia de Hodgkin na fase de para-granuloma de Jackson e Parker ou na predominância linfocitária da classificação de Rye.

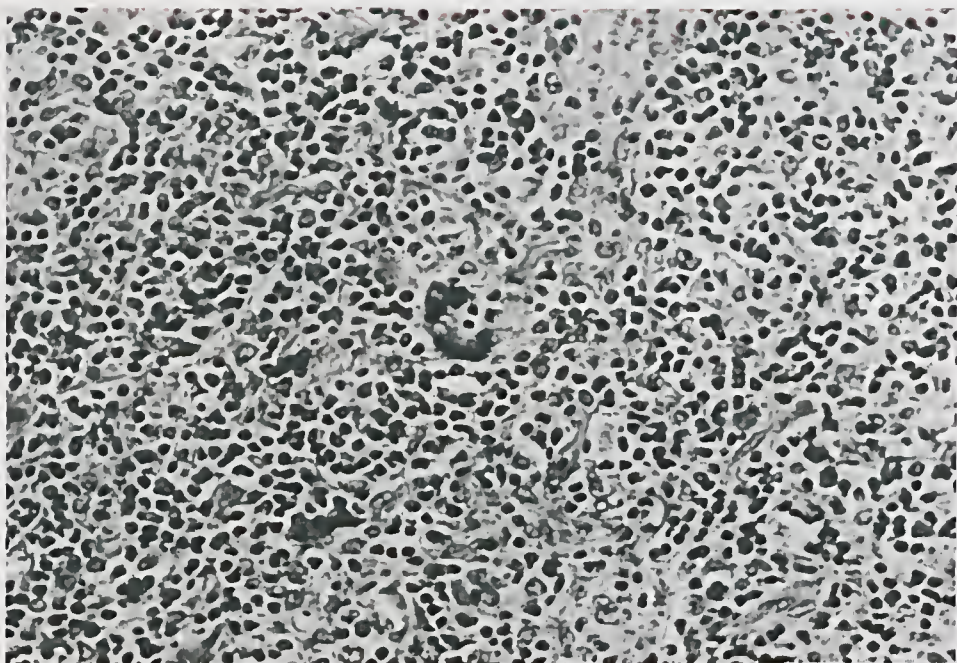
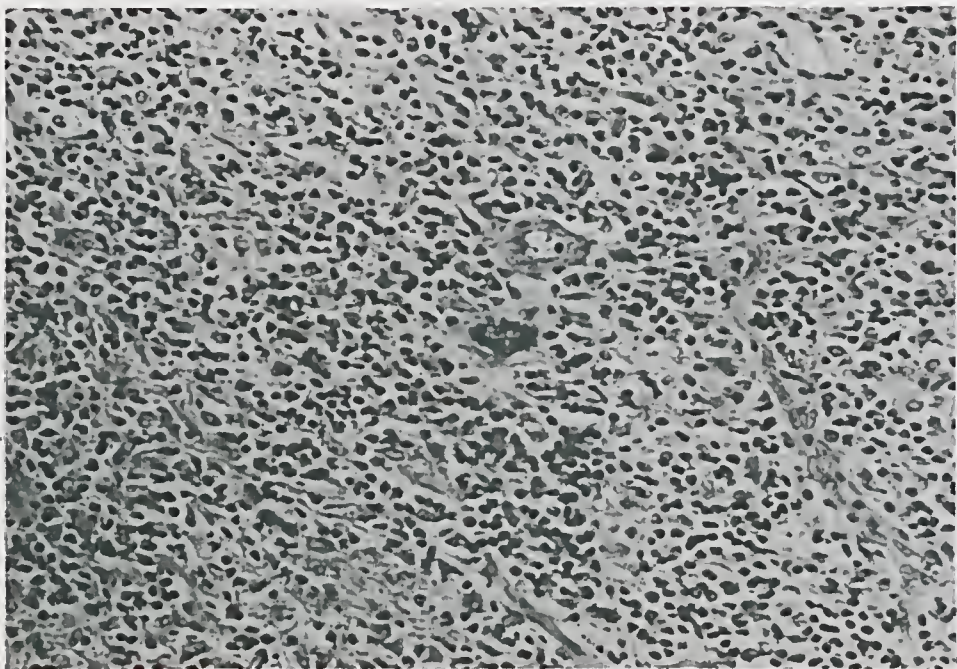



Fig. 1 - Gânglio linfático apresentado na parte central, células gigantes de Warthin-Finkeldey, destacando-se no parênquima. (× 200). Col. H.E.

Fig. 2 - Aspecto do gânglio linfático com a célula de Warthin-Finkeldey, salientando-se no campo, na parte central. (× 220). Col. H.E.

Fig. 3 - Célula gigante de Warthin-Finkeldey, de aspecto moruliforme, representada por aglutinado de núcleos linfocitóides. (× 400). Col. H.E.

Fig. 4 - Célula gigante de Warthin-Finkeldey apresentando núcleos aglutinados. (× 400). Col. H.E.

MACHADO, J. C. & DENARO, L. Relato e considerações sobre a presença de células de Warthin-Finkeldey em paciente portador de moléstia de Hodgkin em atividade. *Mem. Inst. Butantan, 39*: 217-223, 1975.

CONCLUSÃO

O encontro da célula de Warthin-Finkeldey em gânglio linfático de paciente com Moléstia de Hodgkin, sem que o mesmo apresentasse o quadro clínico do sarampo, nos leva a várias suposições. A primeira delas é a de que a célula de Warthin-Finkeldey não seria patognomônica do sarampo, podendo acompanhar outras afecções. Mas, é bem sabido que os pacientes com Moléstia de Hodgkin apresentam deficiências imunológicas bem características e provavelmente essas seriam as responsáveis pelo não aparecimento da Sintomatologia clínica clássica do sarampo. A nossa experiência em Moléstia de Hodgkin é significativa e das centenas de casos que já observamos somente este é que apresentou tal quadro anátomo-patológico. Creio podermos supor que talvez realmente o paciente apresentou o quadro anátomo-patológico do sarampo sem a sua manifestação clínica, pelas peculiaridades imunológicas da Moléstia de Hodgkin de que ele é portador. Somente apreciaríamos acrescentar que nenhuma criança da enfermaria em que o paciente esteve internado apresentou sintomatologia ou quadro clínico específico de sarampo. Após o tratamento específico para a Moléstia de Hodgkin, o paciente encontra-se bem (5-4-1975).

ABSTRACT: The Warthin-Finkeldey cell, present in the lymphoid tissue of patients affected by measles, is considered as specific for this nosological entity. According to numerous authors, when these cells appear in the lymphoid tissues during the preexanthematic phase, not only the anatomo-pathological diagnosis of measles is justified, but even an antecipation of the appearance of the exanthematic eruption is possible. In the present paper, the case of a patient with Hodgkin's disease is presented. A removed cervical lymph node showed numerous Warthin-Finkeldey cells, although the patient did not present any clinical manifestation of measles. No other child in the same hospital ward presented symptomatology of measles. The authors analyse the possible interpretations of these findings.

UNITERMS: Hodkin's disease. Measles. Virology.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AYOAMA, Y. Changes of altered cells infected with measles virus. *Jap. J. exp. Med., 29:* 535-545, 1959.

2. FINKELDEY, W. Über Riesenzellbefunde in den gaumennandeln, zugleica ein Beitrag zur Histopathologie der mandelveränderungen im maser ninkubations stadium. *Wirc. Arch. Path. Anat., 281:* 323, 1931.

3. JANIGAN, D. T. Giant cell pneumonia and measle: an analytical review. *Canad. med. Ass. J., 23:* 741-748, 1961.

4. MATUMOTO, M. Multiplication of measles virus in cell cultures. *Bact. Rev., 30:* 152-176, 1966.

Obs.: Foi realizado estudo do cariograma deste paciente a partir de leucócitos do sangue circulante que está sendo publicado à parte, em colaboração com L. Denaro.

MACHADO, J. C. & DENARO, L. Relato e considerações sobre a presença de células de Warthin-Finkeldey em paciente portador de moléstia de Hodgkin em atividade. *Mem. Inst. Butantan, 39*: 217-223, 1975.

5. ROBERTS, G. B. S. & BAIN, A. D. The pathology of measles. *J. Path. Bact., 76:* 111-118, 1958.

6. WARTHIN, A. S. Occurence of numerous large giant cells in the tonsils and pharingeal mucosa in the prodromial stage of measles. *Arch. Path., 11:* 864, 1931.

Recebido para publicação em 11-IV-1975 e aceito em 28-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 225-231, 1975

CHANGES IN CHROMOSOME STRUCTURES OBSERVED IN PATIENT WITH CONCOMITANT HODGKIN'S DISEASE AND MEASLES. *

LEONOR DENARO, JESUS CARLOS MACHADO AND YAMARA RODRIGUES MARTINS
Secção de Anatomia Patológica, Instituto Butantan

ABSTRACT: A case of a patient presenting an anatomo-pathological picture of concomitant Hodgkin's disease and Warthin-Finkeldey cells, the latter regarded as pathognomonic for measles, without clinical evidence of this infection, led us to study the chromosomal set in the patient's leukocytes. Cells with structural chromosomal aberrations (gaps and breaks) were found in a statistically significant higher frequency in relation to the control. Numerical alterations without statistical significance were also observed.

UNITERMS: Hodgkin's disease. Measles. Chromosomal aspects.

INTRODUCTION

The presence of Warthin-Finkeldey (W-F) giant cells in lymphoid tissues of the human organism, described independently by both authors in 1931, is considered pathognomonic for infection with measles, and seem to be specific reactions of the lymphoid tissue cells against the measles virus.

These giant cells appear during the prodromal phase (± 7 days after infection), and disappear soon after the onset of the rash. They contain a great number of small nuclei of a morula-or-grape-,cluster-like aspect, and are typical for elements of the lymphocytic series.

In the present case we point out the striking concomitance of the anatomo-pathological pictures of measles and Hodgkin's disease, as well as the absence of clinical manifestation of measles in the patient or in any other child in the same hospital ward. This fact seems to justify the publication of this paper although it reports only an isolated case.

* This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisas, Fundo Especial de Despesas do Instituto Butantan and Divisão Nacional do Câncer.
Adress: Caixa postal 65 - São Paulo - Brasil

Once there is an invasion of viral agents, the measles virus in particular, an analysis of the chromosomal set of the patient seems to be appropriate to elucidate the situation, and to establish whether unbalances of the cell metabolism are actually occurring due to this virus invasion.

Generally, upon an atack by physical, chemical and biological agents, one of the cell responses becomes manifest through breakages, often restricted to the vulnerable points of the structure of the chromosomes and through structural dissarray of these elements.

Östergren and Wakonig [15], 1954, described the breakage as an anomaly of the secondary constriction in a single chromatid, or as a typical example of a secondary constriction in one chromatid accompanied by a corresponding break in the other, up to the complet breakage in both chromatids.

Ferguson-Smith et al. [3], 1962, defined the secondary constrictions as contracted regions in both chromosome chromatids, distinct from the centromere, or as a strongly marked-area of negative heteropycnosis.

These sites of secondary constrictions seem to be associated with delayed DNA replication blocks (heterochromatin) where chromosomal aberrations occur with the highest probability (Ferguson-Smith and Handmaker [4], 1961).

Ferguson-Smith et al. [3], 1962, described 20 sites of secondary constrictions, and their relative frequencies in normal human somatic chromosomes; based on this description we analysed our results.

MATERIAL AND METHODS

A 7 year-old male child (A.P.S., register n.º 732.284) of Caucasian origin, was admitted to the Serviço de Pediatria of the Instituto Central — Hospital A. C. Camargo.

Physical and lymphographic examinations showed swollen cervical and inguinal lymph nodes, some of which confluent.

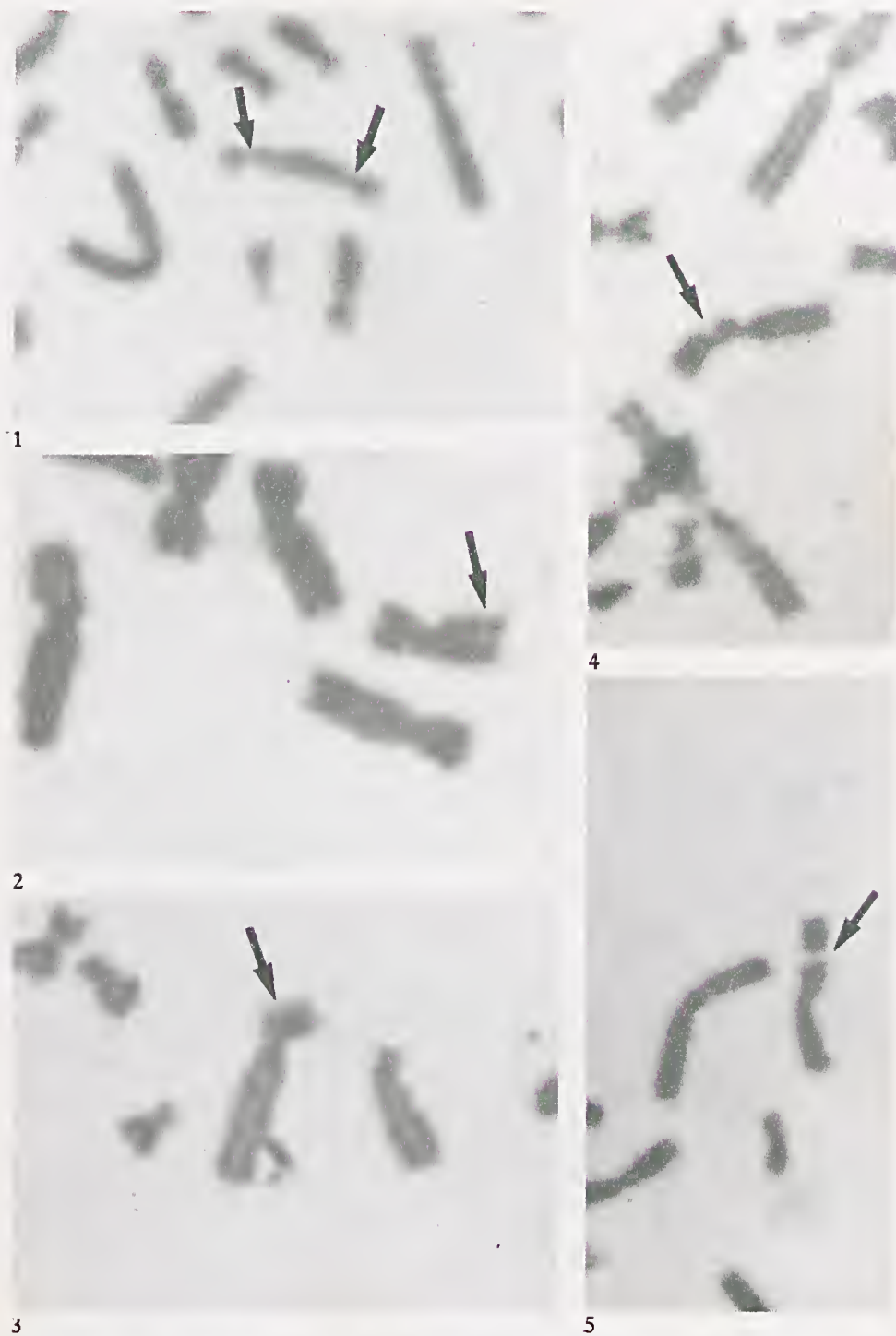
Biopsies of cervical lymph nodes revealed upon histological examination a typical picture of Hodgkin's disease, and the presence of giant cells from the lymphocytic series of Warthin-Finkeldey type (1931) regarded as pathognomonic for infection with measles virus.

The global aspect of the histopathological findings were already described by Machado & Denaro (in press).

At the moment of the surgical exploration, a 10 ml sample of peripheral blood was collected in a heparinized syringe.

Chromosome preparations were obtained from 72 h leukocyte cultures, according to the modified tecnique of Moorhead et al. [10], 1960.

Concomitantly, leukocytes of a healthy individual were cultured as control under the same laboratory conditions.

DENARO, L.; MACHADO, J.C. & MARTINS, Y.R. Changes in chromosome structure observed in patient with concomitant Hodgkin's disease and measles.
Mem. Inst. Butantan, 39: 225-231, 1975.

Figs. 1 to 5 - Types of structural chromosome anomalies observed: 1 - dicentric. 2 e 3 - gap in one chromatid. 4 - break in one chromatid. 5 - break in both chromatids.

DENARO, L.; MACHADO, J.C. & MARTINS, Y.R. Changes in chromosome structure observed in patient with concomitant Hodgkin's disease and measles.
Mem. Inst. Butantan, 39: 225-231, 1975.

Following the descriptions of Ferguson-Smith et al.[3], 1962, and pointing out anew the frailty of these secondary constrictions to physical, chemical and biological agents, we shall try to classify the phenomena found as:

1. Achromatic lesions, breaks or gaps as a discontinuity smaller than the width of chromatid whose distal and proximal portions point in the same direction. These lesions may affect one or both sister chromatids at the same regions, in this case called isochromatidic lesion.
2. Breaks as a discontinuity larger than the width of the proper chromatid, in general with dislocated terminal fragments.

RESULTS

Table 1 summarizes the numerical chromosome picture of the patient APS and the corresponding control.

TABLE 1

Chromosome number	45	46	47	50	80	Total of cells analysed
APS	12	63	—	1	4	80
Control	13	67	—	—	—	80

Table 2 and Figures 1 to 5, summarize, the cell types found in patient APS and the corresponding control.

TABLE 2

Cell types	normal	with structural alterations	Total of cells analysed
APS	64	16 (20%)	80
control	77	3 (3.75%)	80

$$X_1^2 = 10{,}09 : X_c^2 \ (P = 0{,}05) = 3{,}84 : < P < 0{,}01$$

The results of the statistical analysis show that the difference in frequency of those breaks and chromosomal gaps is not due to chance alone. On the

other hand, the frequency of cells with hypodiploid number indicates that such losses are fortuitous in the APS patient as well as in the control.

The frequency of hyperdiploid cells in the APS patient, although higher than in the control, is not significant when the appropriate statistical test is applied. From tables of low frequencies:

$$P = 0{,}29 > Pc = 0{,}025.$$

However, the excess of hyperdiploid cells in the case of the APS patient in relation to its control (5/80 against 0/80) could be significant in a larger sample. Therefore, if it is not demonstrated that divisional faults due to the patient's disease occur, on the other hand such possibility cannot be excluded.

The finding of a dicentric chromosome in one of the hyperdiploid cells under study confirms the occurrence of breaks and possible structural rearrangements.

In view of the forementioned results, and considering the peculiarity of this case, two hypotheses can be suggested.

If we admit that the W.F. cells are really pathognomonic for measles, as Matumoto [8] (1966) and other authors claim, we would have to admit an invasion of measles agents, even through, by reasons unknown, no clinical manifestation of the discase is evident.

Gripenberg [6], 1965, points out an increase in the chromosomal aberration incidence in a lymphocyte culture from a patient affected with measles among other viral infections in relation to the normal control group.

Aula [1], 1965, reports the presence of gaps and chromosomal breakages in patients with measles, mumps and smallpox. In the case of measles, the breaks seem to be distributed at random in all chromosomes; however, in a higher frequency in the long arms.

Norrby et al. [14], 1965, described pulverization phenomena in cells showing a chromosome number higher than normal, produced by the measles viru's action.

If, on the other hand, we reject the hypothesis that W.F. cells are pathognomonic for measles, based on the absence of clinical manifestations of the disease, we would have to blame the possible causal Hodgkin's disease agent as also responsible for the presence of W-F cells and for the increase of the chromosomic aberration incidence in relation to the control group.

Aberrations of the normal chromosome model, such as doubling of the chromosome set, are described for tissue preparations from patients with Hodgkin's disease, as well as for neoplasias in general. Based on these findings, Miles [9], 1973, suggest the hypothesis of a cytogenetic progression in the oncogenesis where in the early stage, or at the moment of oncogenetic transformation, the cell would present a normal chromosomal pattern that later would lead to sucessive doubling of the chromosome set with possible selective advantage to the new population.

The presence of breaks or chromosomal gaps evidenced in preparations obtained from lymph nodes affected by Hodgkin's disease is not mentioned in

the litterature on the cytogenetics of this disease, but descriptions of marker chromosomes together with numerical aberration were given by Coutinho et al. [2], 1971, leading us to assume a previous occurrence of breaks and structural rearrangements, and consequent formation of those marker chromosomes. The fact that we did not find a significant excess of hyperdiploid cells in the APS patient does not disagree with the above findings, since the cited authors worked always with lymph nodes affected by Hodgkin's disease while we used in our study the peripheral blood of the patient. It is conceivable that the frequency of hyperdiploid cells would be much lower in the peripheral blood than in the affected nodes.

Nichols [12], 1966, believes that the possibility must be considered that any virus able to produce genetic rearrangements (activities also verified in oncogenetic viruses) could develop a carcinogenic potential if the exact karyotype for autonomy had been accidentally established. Based on these conclusions, Nichols et al. [13], 1962, and Nichols [11], 1963, point out the increase in frequency of acute lymphatic leukemia during childhood after a serious measles epidemic in Philadelphia, in 1962.

In our opinion, the fact that Hodgkin's disease patients present characteristic immunopathological defects, reinforces our admission of pathognomy of the W.F. cells for measles, since the immunological defect caused by the Hodgkin's disease picture may be responsible for the absence of clinical manifestation of measles.

Acknowledgements: The authors wish to thank Dr. P.A. Otto for his collaboration to the statistical part of this work. Our thanks to Mrs. Sibylle Heller for the translation.

RESUMO: Num caso de paciente apresentando quadro anatomo-patológico concomitante de Moléstia de Hodgkin e células de Warthin-Finkeldey, estas últimas tidas como patognômonicas do sarampo, sem evidências clínicas desta infecção, levou-nos a estudar seu cariótipo. Células com aberrações cromossômicas estruturais (falhas e quebras) foram encontradas com freqüência significativamente maior em relação ao controle. Alterações numéricas sem significância estatística foram também observadas.

UNITERMOS: Moléstia de Hodgkin. Sarampo. Aspectos cromossômicos.

REFERENCES

1. AULA, P. Virus-associated chromosome breakage. A cytogenetic study of chickenpox, measles and mumps patients and of cell cultures infected with measles virus. *Acad. Sci. Fennicae, 89,* 1965.

2. COUTINHO, V.; BOTTURA, C. & FALCÃO, R.P. Cytogenetic studies in malignant lymphomas: a study of 28 cases...*Brit. J. Cancer, 15:* 789-801, 1971.

3. FERGUSON-SMITH, M. A.; FERGUSON-SMITH, M. E.; ELLIS, P. M. & DICKSON, M. The sites and relative frequencies of secondary constrictions in human somatic chromosomes. *Cytogenetics, 1:* 325-343, 1962.

4. FERGUSON-SMITH, M. A. & HANDMAKER, S. D. Observations on the satellited human chromosomes. *Lancet, I*(7178): 638-640, 1961.

5. FINKELDEY, W. Über riesenzellbefunde in den Gaumennandelm zugleica un Beitrag sur Histopathologie der mandelveränderungen in maser ninkubations stadium. *Wirc. Arch. Path. Anat., 281:* 323, 1931.

6. GRIPENBERG, U. Chromosome studies in some virus infections. *Hereditas, 54:* 1-18, 1965.

7. MACHADO, J. C. & DENARO, L. Relato e considerações sobre a presença de células de Warthin-Finkeldey em paciente portador de Moléstia de Hodgkin em atividade. *Mem. Inst. Butantan* (no prelo).

8. MATUMOTO, M. Multiplication of measles in cell cultures. *Bact. Rev., 30:* 152-176, 1966.

9. MILES, C. P. Chromosomes changes in Hodgkin's disease. International Symposium on Hodgkin's Disease. *Nat. Cancer Inst. Monogr., 36:* 197-201, 1973.

10. MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M. & HUNGERFORD, D. A. Chromosome preparations of leukocyte culture from human peripheral blood. *Exp. Cell Res., 20:* 613-616, 1960.

11. NICHOLS, W. W. Relationships of viruses, chromosome and carcinogenesis. *Hereditas, 50:* 53-80, 1963.

12. NICHOLS, W. W. The role of viruses in the etiology of chromosomal abnormalities. *Amer. J. hum. Genet., 18:* 81-92, 1966.

13. NICHOLS, W. W.; LEVAN, A.; HALL, B. & CATERGREN, G. Measles. Associated chromosome breakage. *Hereditas, 48:* 367-370, 1962.

14. NORRBY, E.; LEVAN, A. & NICHOLS, W. W. The correlation between the chromosome pulverization effect and other biological activities of measles virus preparations. *Exp. Cell Res., 41:* 483-491, 1965.

15. ÖSTERGREN, G. & WAKONIG, T. True or apparent sub-chromatid breakage and the induction of labile states in cytological chromosome loci. *Bot. Not.,* : 357-375, 1954.

16. WARTHIN, A. S. Occurence of numerous large giant cells in the tonsils and pharingeal mucosa in the prodomial stage of measles. *Arch. Path., 11:* 864, 1931.

Recebido para publicação em 30-V-1975 e aceito em 28-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 233-238, 1975

PSEUDOTUBERCULOSE EM CAMUNDONGOS. ISOLAMENTO DE *CORYNEBACTERIUM KUTSCHERI* DA CAVIDADE ORAL E DA PELE DE ANIMAIS DOENTES E APARENTEMENTE SÃOS.

BRUNO SOERENSEN, MARIA JOSÉ FARABELLO YARID,
LUIZ ZEZZA NETO e JESUS CARLOS MACHADO
Divisão de Microbiologia e Imunologia e Divisão de Patologia,
Instituto Butantan

RESUMO: Foi estudada uma epizootia de pseudotuberculose que acometeu cerca de 40% de uma criação de aproximadamente 20.000 camundongos no Instituto Butantan, tendo-se isolado *Corynebacterium kutscheri* do material purulento de nódulos subcutâneos e realizado o respectivo estudo histopatológico.

Corynebacterium kutscheri foi ainda isolado da cavidade oral de 68% dos animais doentes e de 82% de animais aparentemente sãos da mesma criação. A superfície da pele dos animais doentes não revelou a presença do germe; entretanto, de 6% dos animais aparentemente sãos, pôde a bacteria ser isolada da superfície cutânea.

De acordo com a literatura compulsada, esta é a primeira vez que se registra o isolamento de *Corynebacterium kutscheri* da cavidade oral e da superfície cutânea de camundongos doentes e aparentemente sãos. A verificação ora realizada sugere a possibilidade da detecção de portadores através da pesquisa do germe na cavidade oral.

UNITERMOS: *Corynebacterium kutscheri*. Pseudotuberculose de camundongos. Isolamento de *Corynebacterium kutscheri* da cavidade oral e da pele de camundongos.

INTRODUÇÃO

Há aproximadamente 20 anos, vinham sendo observados, na criação de camundongos do Instituto Butantan, animais com nódulos subcutâneos localizados preferencialmente na região dorsal.

Endereço para correspondência: Caixa postal 65 - São Paulo - Brasil

SOERENSEN, B.; YARID, M.J.F.; ZEZZA NETO, L. & MACHADO, J.C. Pseudotuberculose em camundongos. Isolamento de *Corynebacterium kutscheri* da cavidade oral e da pele de animais doentes e aparentemente sãos.
Mem. Inst. Butantan, 39: 233-238, 1975.

Recentemente, o aumento da incidência de tais nódulos nos camundongos fornecidos ao Serviço de Controle do Instituto para provas de inocuidade focalizou a atenção sobre a moléstia em causa, que pôde ser identificada à pseudotuberculose.

A primeira referência sobre a pseudotuberculose do camundongo foi feita em 1894 por Kutscher [10], o qual isolou um germe que denominou *Bacillus pseudotuberculosis murium*, mais tarde denominado por Migula, *Bacterium kutscheri*. Nesta oportunidade, foi reproduzida experimentalmente a doença mediante a inoculação pela via intraperitoneal, observando-se lesões localizadas no baço, fígado e rins.

O mesmo germe foi isolado novamente de casos de pseudotuberculose em 1901 por Bongert [3]. Em 1927, Holzhauzen [8] isolou, de casos de septicemia de camundongos, o *Corynebacterium murisepticum*, que produziu, à inoculação experimental, septicemia mortal em 48 horas.

Condrea [4], em 1930, isolou germe que denominou *Corynebacterium murium*, de uma doença do camundongo, caracterizada também pela ocorrência de abcessos subcutâneos, porém considerada distinta da pseudotuberculose e reproduziu-a experimentalmente mediante a inoculação pela via intravenosa, verificando lesões nos rins e pulmões.

Em 1931, Fischl e col. [5] descreveram uma artrite purulenta em camundongo, provocada por um germe ao qual deram o nome de *Corynebacterium arthritidis-murium* e, em 1945, Polak [12] observou em camundongos uma epizootia de hepatite supurada, com elevada mortalidade, que relacionou ao *Corynebacterium pseudotuberculosis-murium*.

Friedlander e col. [6], em 1951, isolaram igualmente germe do gênero *Corynebacterium* de camundongos que apresentavam abscessos subcutâneos, tendo feito inoculações pela via intraperitoneal e verificado que grande parte dos animais morria, mostrando, à necrópsia, abscessos múltiplos nos pulmões, rins, fígado e baço.

Bicks [1], em 1957, descreveu também a doença em camundongos, nos quais registrou lesões caseosas no fígado, pulmão, baço e coração, além de abscessos subcutâneos. Identificou o microorganismo como sendo *Corynebacterium pseudotuberculosis-murium*.

Juillan [9], em 1959, isolou de camundongos com lesões pulmonares, germe que identificou à bacteria primeiramente isolada por Kutscher, para a qual Bergey et al., em 1929, adotaram a denominação de *Corynebacterium kutscheri*, que passou a prevalecer.

Pestana de Castro e col. [11], em 1964 e Giorgi e col. [7], em 1965, relataram a ocorrência da moléstia em criações de camundongos e de ratos, bem como o isolamento de *Corynebacterium kutscheri* de abscessos localizados no fígado, rins, pulmões e baço.

O presente trabalho refere o isolamento de *Corynebacterium kutscheri* da cavidade oral e da pele de animais doentes e aparentemente sãos de uma colonia de camundongos do Instituto Butantan, com elevada incidência de pseudotuberculose.

SOERENSEN, B.; YARID, M.J.F.; ZEZZA NETO, L. & MACHADO, J.C. Pseudotuberculose em camundongos. Isolamento de *Corynebacterium kutscheri* da cavidade oral e da pele de animais doentes e aparentemente sãos.
Mem. Inst. Butantan, *39*: 233-238, 1975.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram retirados ao acaso 19 camundongos adultos, de ambos os sexos, de uma criação de aproximadamente 20.000 animais, na qual cerca de 40% dos adultos apresentava doença de evolução crônica, manifestada pela presença de nódulos subcutâneos localizados preferentemente na região dorsal (Fig. 1).

Os animais foram sacrificados e, à necrópsia, pelo exame macroscópico observou-se grande número de abscessos no tecido subcutâneo, cujo diâmetro media de 0,3 a 0,5 cm. Os demais órgãos e tecidos apresentavam-se normais.

Do pus dos abscessos foram feitos esfregaços e colorações pelos métodos de Gram e Zichl-Neelsen. Paralelamente, realizaram-se exames diretos, entre lâmina e lamínula, para pesquisa de fungos. Parte do material foi reservada para culturas em placa de ágar sangue em meio de tioglicolato modificado por Brewer, incubados a 37°C por 24 horas, e em meio de Sabouraud sólido, mantido a 25°C durante 3 meses.

Para o exame histopatológico, retiraram-se fragmentos dos diversos órgãos e dos abscessos subcutâneos, que foram fixados em formol a 10%.

Finalmente, procedeu-se a culturas do material retirado da cavidade oral e da superfície da pele dos 19 animais doentes, assim como de 51 animais aparentemente sãos, a fim de investigar a presença da corinebactéria, já que abcessos idênticos aos da infecção em causa podiam ser provocados, como tivemos a ocasião de verificar, pela mordedura na pele dos animais que se atacavam mutuamente.

RESULTADOS

Exames bacterioscópicos do material retirado dos abscessos subcutâneos revelaram, ao lado de numerosos leucócitos, a presença de bacilos gram-positivos de aspecto difteróide (Fig. 2). Os exames feitos para pesquisa de fungos, assim como para bacilos ácido-resistentes, resultaram negativos.

Em todos os tubos contendo meio de tioglicolato Brewer, houve crescimento de *C. kutscheri*, que, nas placas de ágar-sangue, após 24 horas a 37°C, desenvolveu pequenas colônias lisas, de côr branco-amarelada, bordos irregulares, medindo aproximadamente 1 mm de diâmetro. O estudo bacteriológico destas culturas revelou tratar-se de bacilos gram-positivos semelhantes aos observados nos esfregaços feitos com material retirado dos abscessos subcutâneos (Fig. 3).

O microorganismo isolado foi enviado, para confirmação diagnóstica, ao Dr. Robert E. Weaver, do "Center for Disease Control, Department of Health, Education and Welfare Public Health Service, Atlanta, Georgia, U.S.A.", ao qual consignamos o nosso agradecimento.

Quanto aos exames histopatológicos, revelaram o seguinte resultado: 1) Pele — presença de abscessos com área central de necrose, rodeada por zona edemaciada, na qual se observaram hiperemia vascular, presença de polimorfonucleares e de raros linfoplasmócitos esparsos; 2) Fígado — focos ocasionais de polimorfonucleares, com escassos linfoplasmócitos nos espaços-porta; 3)

SOERENSEN, B.; YARID, M.J.F.; ZEZZA NETO, L. & MACHADO, J.C. Pseudotuberculose em camundongos. Isolamento de *Corynebacterium kutscheri* da cavidade oral e da pele de animais doentes e aparentemente sãos.
Mem. Inst. Butantan, 39: 233-238, 1975.

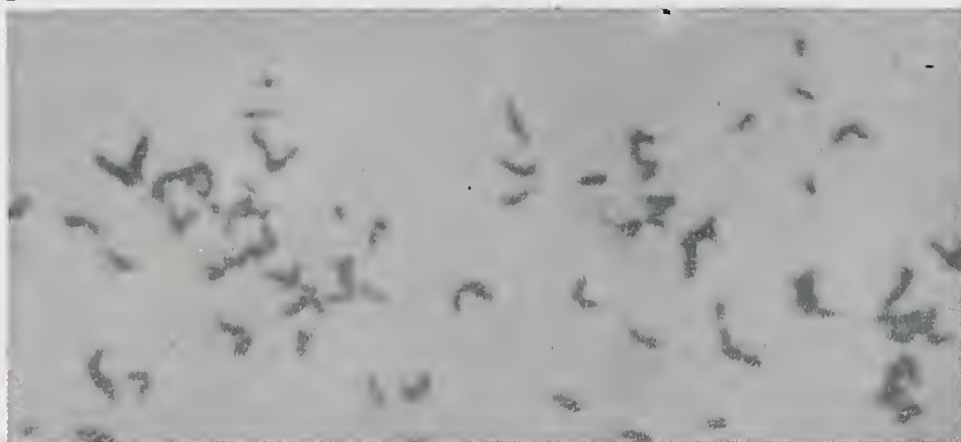
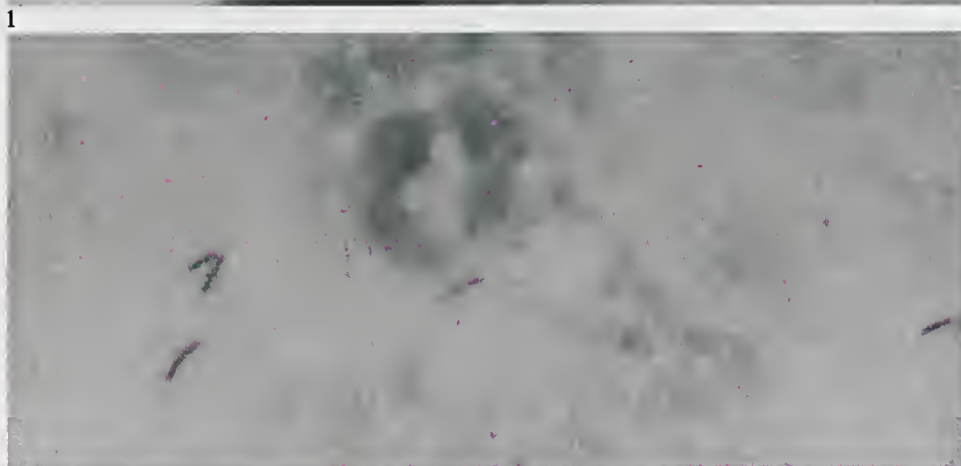
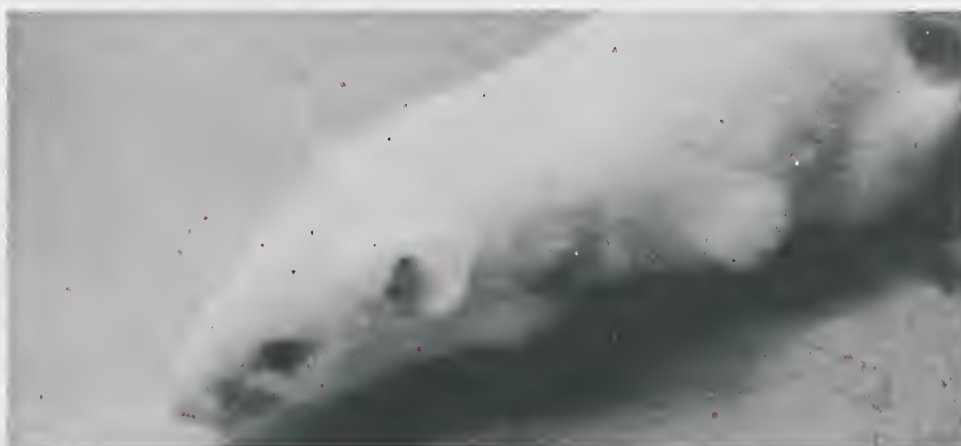



Fig. 1 - Camundongo apresentando nódulos subcutâneos.

Fig. 2 - Exame bacterioscópico de material retirado dos nódulos. Coloração de Gram.

Fig. 3 - Aspecto microscópico do germe isolado.

Rim — hiperplasia glomerular e dos vasos medulares, raras infiltrações de polimorfonucleares; 4) Baço — discreta proliferação da polpa branca, com numerosas células gigantes bi ou multinucleadas, de citoplasma acidófilo.

As culturas feitas do material retirado da cavidade oral e da superfície da pele, com o intuito de revelar a presença de portadores, deram os resultados consignados na Tabela 1.

TABELA 1

Isolamento do *Corynebacterium kutscheri* da cavidade oral e da superfície da pele de camundongos aparentemente sãos ou com pseudotuberculose.

Estado do Animal	Percentagem de isolamento	
	Cavidade oral	Superfície da pele
Aparentemente sãos	82 (43/51)	6 (2/32)
Doentes	68 (13/19)	0 (0/19)

CONCLUSÕES

A doença estudada, por suas características clínicas, lesões anatopatológicas, macro e microscópicas, bem como pelos achados bacteriológicos, pôde ser identificada à pseudotuberculose.

Deve ser especialmente mencionado que o agente causador, identificado ao *C. kutscheri*, pôde ser isolado com maior frequência da cavidade oral de animais doentes do que dos aparentemente sãos da mesma colônia.

Segundo sugestão feita por Bicks [1] em 1957, a transmissão da moléstia possivelmente se processaria por ingestão, em virtude da verificação da presença de *Corynebacterium kutscheri* em ulcerações do intestino e em nódulos linfáticos mesentéricos.

Embora trabalhosa, a identificação de portadores, poderá, portanto, ser feita através da pesquisa do germe na cavidade oral dos camundongos. Seja ainda ressaltada a necessidade imprescindível de iniciar colonias de camundongos a partir de reprodutores livres do germe patogênico.

SUMMARY: In the course of an epizootic outbreak of pseudotuberculosis affecting 40% of a colony of approximately 20.000 mice, *Corynebacterium kutscheri* was isolated from subcutaneous nodules and an histopathological study of the cases was performed.

Corynebacterium kutscheri was present in the mouth of about 68% of sick animals and 82% of apparently healthy animals of the same breeding colony. The microorganism could

not be demonstrated on the skin surface of sick animals. However, from 6% of apparently healthy mice, *Corynebacterium kutscheri* has been isolated from the skin.

These findings, for the first time registered in the literature, suggest the possibility of detecting carriers through the demonstration of the microorganism in the mouth.

UNITERMS: *Corynebacterium kutscheri.* Mouse pseudotuberculosis. Isolation of *Corynebacterium kutscheri* from the mouth and skin of mice.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BICKS, V.A. Infection of laboratory mice with *Corynebacterium murium. Austr. J. Sci, 20:* 20-22, 1957.
2. BREED, R.S.; MURRAY, E.G.D. & SMITH, N.R. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7.ª ed. Baltimore, Williams, 1957.
3. BONGERT, *In* Dumas, J. Les animaus de Laboratoire. Paris, Flammarion, 1953.
4. CONDREA, P. Nouvelle maladie contagiuse de la souris blanche. Agent pathogène. Maladie expèrimentale. *C. R. Soc. Biol.* (Paris), *104:* 1361-1363, 1930.
5. FISCHL, V.; KOECH, M. & KUSSAT, E. Infektarthritis bei Murien. *Z. Hyg. Infekt.-Kr., 112:* 421, 1931.
6. FRIEDLANDER, H. et al. Experimental arthritis in albino rats produced by a strain of *Corynebacterium. J. inf. Dis., 88:* 290-297, 1951.
7. GIORGI, W. et al. Infecção espontânea de camundongos por *Corynebacterium kutscheri.* Ocorrência de um surto epizoótico. *Biológico, 31*(12): 284-289, 1965.
8. HOLZHAUZEN, V.C. Ein bisher undekannter Erreger Mauseptikamie (*Corybacterium musisepticum* n. sp.). *Zbl. Bakt., I. Abt. Ref., 105:* 94-99, 1928.
9. JUILLAN, M. Pseudo-tuberculosis in with mice caused by *Corynebacterium murium. Arch. Inst. Pasteur Algér., 37:* 198-201, 1959.
10. KUTSCHER, Ein Beitrag zur Kenntniss der bacillaren pseudo-tuberculose der Nagethiere. *Z. Hyg. Infekt.-Kr., 18:* 327-342, 1894.
11. PESTANA DE CASTRO et al. Estudo de uma amostra de *Corynebacterium kutscheri* isolada de ratos e camundongos. Infecção experimental. *Arch. Inst. biol.* (S. Paulo), *31*(3): 91-99, 1964.
12. POLAK, M. Epidèmie survenue parnú les souris blanches à la suite d'une infection par le *Corynebacterium pseudo-tuberculosis murium. Antonie. v. Leeuwenhoeck, 10: 23,* 1944/45.

Recebido para publicação em 11-V-1975 e aceito em 28-IX-1975.

Mem. Inst. Butantan
39: 239-245, 1975

LISTA REMISSIVA DOS TRABALHOS PUBLICADOS NAS "MEMÓRIAS DO INSTITUTO BUTANTAN". *

Volumes 34 a 38 (1969-1974)

OFÍDIOS
Sistemática

726. AMARAL, A. do Ofionímia Ameríndia na Ofiologia Brasiliense. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 1-16, 1973.

727. CORDEIRO, C.L.S. & HOGE, A.R. Contribuição ao conhecimento das serpentes do Estado de Pernambuco. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 261-290, 1973.

728. HOGE, A.R. *Chironius scurulus* (Wagler) recorded from Venezuela. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 85-86, 1969.

729. HOGE, A.R. Notes on Holotype of *Dipsas indica cisticeps* (Boettger). (Serpentes, *Dipsadinae*). *Mem. Inst. Butantan, 34:* 87-88, 1969.

730. HOGE, A.R. & FEDERSONI JR., P.A. Notes on *Xenopholis* Peters and *Paroxyrhopus* Schenkel (Serpentes, *Colubridae*). *Mem. Inst. Butantan, 38:* 137-144, 1974.

731. HOGE, A.R. & LIMA VERDE, J.R. *Liophis mossoroensis* nov. sp. do Brasil (Serpentes, *Colubridae*). *Mem. Inst. Butantan, 36:* 215-220, 1972.

732. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. Notes on *Pseutes dieperinckii* (Schlegel) — Serpentes. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 89-92, 1969.

733. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. A new species of *Chironius* (Serpentes, *Colubridae*). *Mem. Inst. Butantan, 34:* 93-96, 1969.

734. HOGE, A.R. & ROMANO S.A. *Micrurus hemprichii hemprichii* recorded from Brazil (Serpentes, *Elapidae*). *Mem. Inst. Butantan, 35:* 107-110, 1971.

735. HOGE, A.R. & ROMANO S,A. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil (Serpentes, *Elapidae* e *Viperidae*). *Mem. Inst. Butantan, 36:* 109-208, 1972.

736. HOGE, A.R. & ROMANO, S.A. Notes on *Trimercsurus brongersmai* Hoge 1969 (Serpentes *Viperidae, Crotalinae*). *Mem. Inst. Butantan, 38:* 145-158, 1974.

737. HOGE, A.R.; ROMANO, S.A.; FEDERSONI JR., P.A. & CORDEIRO, C.L.S. Lista das espécies de serpentes coletadas na região da usina hidroelétrica de Ilha Solteira, Brasil (Nota prévia). *Mem. Inst. Butantan, 38:* 167-178, 1974.

---

* A lista correspondente aos volumes 1 a 33 foi publicada no volume 34.

738. HOGE, A.R.; SANTOS, N.P.; HEITOR, C.; LOPES, L.A. & SOUZA, I.M. Serpentes coletadas pelo Projeto Rondon VII em Iauareté, Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 221-232, 1972.

739. ROMANO, S.A. Notes on *Leptomicrurus* Schmdit. *Mem Inst. Butantan, 35:* 111-116, 1971.

740. ROMANO, S.A. & HOGE, A.R. Nota sobre *Xenodon* e *Ophis* (Serpentes, *Colubridae). Mem. Inst. Butantan, 36:* 209-214, 1972.

OFÍDIOS
Biologia

741. LANGLADA, F.G. de Ciclo sexual bienal de serpentes *Crotalus* do Brasil. Comprovação. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 67-72, 1972.

742. LANGLADA, F.G. de & BELLUOMINI, H.E. Contribuição à técnica operatória de serpentes. I. Hemipenicectomia bilateral em serpentes. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 73-78, 1972.

743. LANGLADA, F.G. de & BELLUOMINI, H.E. Contribuição à técnica operatória de serpentes. III. Ablação de glândulas de veneno em serpentes do gênero *Crotalus. Mem. Inst. Butantan, 36:* 89-100, 1972.

744. LANGLADA, F.G. de; GONÇALVES, M.F. & RODRIGUES, E.T. Determinação da época de fecundidade em fêmeas do gênero *Crotalus. Mem Inst. Butantan, 37:* 253-260, 1973.

745. LANGLADA, F.G. de & SHINOIYA, N. Contribuição à técnica operatória de serpentes. II. Derivação intestinal, colostomia e cloacrorrafia (para obtenção de urina sem contaminação fecal em cloaca de serpentes). *Mem. Inst. Butantan, 36:* 79-88, 1972.

ARACNÍDEOS E ARTRÓPODOS
Sistemática

746. BUCHERL, W. Aranhas da família *Ctenidae. II. Phoneutriinae,* subfamília nova. *Mem. Inst. Butantan, 34*: 25-32, 1969.

747. BUCHERL, W.; COSTA, A.T. & LUCAS, S. Revisão de alguns tipos de aranhas caranguejeiras (Orthognatha) estabelecidos por Mello-Leitão e depositados no Museu Nacional do Rio. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 117-138, 1971.

748. BUCHERL, W. & DESSIMONI von EICKSTEDT, V.R. Aranhas da família *Ctenidae,* Sub-família *Phoneutriinae.* V. A segunda fila ocular em *Phoneutria* Perty, 1833. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 43-46, 1969.

749. BUCHERL, W. & LUCAS, S. Sobre a posição sistemática de *Porrima callipoda* Mello Leitão 1924 (*Aranae — Lycosidae*). Nota prévia. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 267-268, 1972.

750. BUCHERL, W.; LUCAS, S. & DESSIMONI von EICKSTED, V.R. Spiders of the family *Ctenidae,* subfamily *Phoneutriinae.* VI. *Bibliographia Phoneutriarum. Mem. Inst. Butantan, 34:* 47-66, 1969.

751. DESSIMONI von EICKSTEDT, V.R. Aranhas da família *Ctenidae,* sub-família *Phoneutriinae.* III. Redescrição do macho de *Phoneutria fera* Perty, 1833. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 33-36, 1969.

752. DESSIMONI von ECIKSTEDT, V.R. & LUCAS, S. Revisão dos tipos de *Phoneutria paca* (Mello-Leitão) 1922 e *Phoneutria luederwaldti* (Mello Leitão) 1927. (*Aranae; Labidognatha, Ctenidae). Mem. Inst. Butantan, 34:* 75-78, 1969.

COMISSÃO EDITORIAL Lista remissiva dos trabalhos publicados nas "Memórias do Instituto Butantan". Volumes 34 a 38 (1969-1974).
Mem. Inst. Butantan, 39: 239-245, 1975.

753. DESSIMONI von EICKSTEDT, V.R.; LUCAS, S. & BUCHERL, W. Aranhas da família *Ctenidae*, sub-família *Phoneutriinae*. VII. Contribuição ao estudo de *Phoneutria fera* Perty, 1833. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 67-74, 1969.

754. LUCAS, S. & BUCHERL, W. Redescrição de *Dryptopelmides* Strand 1907 *(Aranae, Theraphosidae, Ischnocolinae)* e descrição de *Dryptopelmides rondoni* sp. n. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 233-240, 1972.

755. STEWIEN, K.E. Estudos sistemáticos sobre aranhas caranguejeiras, Descriação da fêmea de *Acanthoscurria musculosa* Simon 1892. *(Aviculariidae, Theraphosinae*). *Mem. Inst. Butantan, 34:* 79-84, 1969.

ARACNÍDEOS E ARTRÓPODOS
Biologia

756. BUCHERL, W. Escorpionismo no Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 9-24, 1969.

757. DESSIMONI von EICKSTEDT, V.R. Some complementary notes on the biology of *Exetasis eickstedtae* Schlingen 1972, a fly parasiting Mygalomorph spiders. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 131-136, 1974.

758. LUCAS, S. Aranhas da família *Ctenidae*, sub-família *Phoneutriinae*. IV. Contribuição ao estudo da ooteca, dos ovos e a eclosão da aranha armadeira *Phoneutria* sp. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 37-42, 1969.

PATOLOGIA

759. AMORIM, M.F. de; MELLO, R.F. de & SALIBA, F. Lesões renais induzidas experimentalmente no cão pelo veneno crotálico. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 137-158, 1969.

760. BEUTNER, E.; WODD, G.W.; CHORZELSKI, T.P.; ABREU LEME, C. & BIER, O.G. Produção de lesões semelhantes às do Pênfigo Foliáceo pela injeção intradérmica em coelhos e macacos, de soros de doentes com título elevado de auto-anticorpo. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 79-94, 1971.

761. FRANCO DA SILVEIRA F.º, J. & MACHADO, J.C. Alterações do epitélio e esfregaços vaginais da preá (*Cavia aperea aperea*) durante o ciclo estral e estudo comparativo com as da cobaia. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 63-78, 1971.

762. LANGLADA, F.G. de Anomalias congênitas em uma ninhada de cascaveis. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 239-252, 1973.

763. LANGLADA, F.G. de; BELLUOMINI, H.E. & MACHADO, J.C. Conseqüências da ablação cirúrgica da glândula principal de venenos em *Crotalus*. Comportamento do animal e estudo histopatológico da glândula acessória. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 101-108, 1972.

764. MACHADO, J.C. Incidência e comprometimento cardíaco pela gota úrica em *Crotalus d. terrificus*. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 159-164, 1969.

765. MACHADO, J.C. & DENARO, L. Obtenção de culturas de linfomas humanos — Tumor de Burkitt. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 163-166, 1974.

766. MACHADO, J.C. & FRANCO DA SILVEIRA, F.º, J. Obtenção experimental do quadro anatomopatológico da pancreatite hemorrágica aguda no cão pela inoculação de veneno de *Tityus serrulatus*. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 159-162, 1974.

COMISSÃO EDITORIAL Lista remissiva dos trabalhos publicados nas "Memórias do Instituto Butantan". Volumes 34 a 38 (1969-1974).
Mem. Inst. Butantan, 39: 239-245, 1975.

767. MACHADO, J.C.; FRANCO DA SILVEIRA F.º, J. & RUSSO, A.D. Epidemiology of Hodgkin"s disease in children. A study of 36 cases. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 55-62, 1971.

768. MACHADO, J.C.; KONDA, I. & LIMA, L.S. Ocorrência de neoplasia mesenquimal fuso-celular em peixe da espécie *Moenkhausia dichroura* (Kner, 1858). *Mem. Inst. Butantan, 37:* 233-238, 1973.

769. MACHADO, J.C. & ROSENFELD, G. Achados anatomopatológicos em necroscopia de paciente falecido por envenenamento elapídico. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 41-54, 1971.

770. MACHADO, J.C.; SOERENSEN, B.; AMARAL, J.P.; PINTO, E.A. & DONOSO, N. Avaliação histopatológica comparativa da intensidade do fenômeno proliferativo na imunidade celular à tuberculose, em cobaios vacinados oralmente e intradérmicamente pelo BCG. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 57-66, 1972.

771. PIAZZA, R. Lesões da medula espinhal no megacólon. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 149-232, 1973.

772. SALIBA, F. & MACHADO, J.C. Comprometimento dos vasos nutridores da aorta em dois casos de ruptura espontânea dessa artéria em equinos soro-produtores. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 165-170, 1969.

PARASITOLOGIA

773. ARTIGAS, P.T. & PEREZ, M.D. Sistemática de *Opisthoponimidae (Trematoda, Plagiorchoidea).* Criação da família *Bieriidae* n.fam. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 97-110, 1969.

774. BIASI, P.; PESSÔA, S.B. & BELLUOMINI, H.E. Novas observações sobre a transmissão congênita de hematozoários de serpentes peçonhentas vivíparas. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 245-250, 1972.

775. DESSIMONI von EICKSTEDT, V.R. Three cases of parasitism in the Mygalomorph spider *Lasiodora klugi* (C.L. Kock) by a fly of the genus *Exetasis (Diptera, Acroceridae)* in Brazil. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 139-146, 1971.

776. FONTENELLE, T.J.H. Bionomia de *Triatoma pseudomaculata* Corrêa & Spinola 1964, em laboratório. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 251-262, 1972.

777. PESSÔA, S.B. & BIASI, P. Considerações taxonômicas sobre cistos esquizogônicos e sobre gametócitos de *Hepatozoon (Sporozoa, Haemogregarinidae)* parasitas de serpentes brasileiras. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 291-298, 1973.

778. PESSÔA, S.B. & BIASI, P. Nota taxonômica sobre cistos esporogônicos de algumas espécies de *Hepatozoon (Sporozoa, Haemogregarinidae)* parasitas de serpentes brasileiras. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 299-308, 1973.

779. PESSÔA, S.B. & BIASI, P. Plasmódio de uma lagartixa *Urostrophus vautieri* D. & B. *(Sauria, Iguanidae). Mem. Inst. Butantan, 37:* 309-316, 1973.

780. PESSÔA, S.B.; BIASI, P. & PUORTO, G. Nota sobre a frequência de hemoparasitas em serpentes do Brasil. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 69-118, 1974.

781. PESSÔA, S.B.; BIASI, P. & SACCHETTA, L. Evolução do *Hepatozoon* sp. parasita de *Leptophis ahaetulla* (Lineu) (Serpentes, *Colubridae*) no *Culex fatigans. Mem. Inst. Butantan, 38:* 119-122, 1974.

782. PESSÔA, S.B.; BIASI, P. & SACCHETTA, L. Notas sobre o *Hepatozoon tupinambis* (Laveran & Salibeni, 1909) *(Protozoa, Apicomplexa)* parasita do *Teju (Tupinambis teguixin* Lineu, 1758) *(Sauria, Teiidae). Mem. Inst. Butantan, 38:* 123-130, 1974.

783. PESSÔA, S.B.; BIASI, P. & SOUZA, D.M. Esporulação no *Culex dolosus* (L. Arribalzaga, 1891) do *Hepatozoon roulei* (Phisalix e Laveran, 1913) parasita de *Bothrops alternatus* (D. & B., 1854), transfundido com o sangue da *Bothrops moojeni* Hoge, 1965. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 241-244, 1972.

784. SOERENSEN, B.; ZEZZA NETO, L.; PEREZ, M.D.; BULKA, G.M. & ONO, A.E.G. Presença de *Cysticercus pisiformes*, (Bloch, 1780) em coelho e lebre importados. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 63-68, 1974.

785. TRAVASSOS F.º, L. *Triatoma williami* Galvão, Souza e Lima, 1965, capturado em Mato Grosso, BR, novo vector da Moléstia de Chagas. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 263-266, 1972.

786. TRAVASSOS, L.P.; SOERENSEN, B. & FONTENELLE, T.H. Ação larvi e molusquecida do "Tego 51". *Mem. Inst. Butantan, 37:* 317-326, 1973.

QUÍMICA

787. ZELNIK, R. & STREHLAU, F. β-Oxo N-Substituted Benzezoles. I. The β-Acylethylation of Benzimidazoles with Mannich Bases. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 147-156, 1971.

BACTERIOLOGIA

788. PELUFFO, C.; IRINO, K. & MELLO, S. Virulencia y multirresistencia a drogas de cepas epidemicas de *S. typhimurium* aisladas en hospitales infantiles de Sudamerica. I. Virulencia comparativa para el raton de cepas epidemicas y no epidemicas de *S. typhimurium*. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 1-12, 1974.

789. SOERENSEN, B. & ROSENBERG, G.M. A antibioticoterapia no choque transfusional por sangue contaminado. Estudo experimental em camundongos. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 41-50, 1972.

790. SOERENSEN, B.; YOSHIO, M.E. & ROCHA, M.C. Determinação da contaminação bacteriana em sangue estocado através da dosagem de glicose com tira reagente. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 51-56, 1972.

VIROLOGIA
Microscopia Eletrônica

791. BRUNNER JR., A. Erythrocytary maturation in rodents. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 1-40, 1971.

792. BRUNNER JR., A.; COIRO, J.R.R.; SCHWANTES, M.L. & SCHWANTES, A.R. Hemosome and hemoglobin biosynthesis in embryos and in regressive anemias. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 335-344, 1973.

793. COIRO, J.R.R.; BRUNNER JR., A.; SCHWANTES, M.L. & SCHWANTES, A.R. Hemoglobin in mitochondrion-like organelles of immature chick embryo erythrocytes. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 327-334, 1973.

794. MENEZES, H.; MITSUTANI, C.Y.; COIRO, J.R.R.; CARVALHO DOS SANTOS, M.A. & BRUNNER JR., A. Ultrastructure of mature erythrocytes from five bothropic species. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 51-62, 1974.

795. RIZZO, E. de; BRUNNER JR., A. & VALLEJO-FREIRE, A. Multiplication of Myxoma Virus in epithelial cell culture of rabbit kidney. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 121-128, 1969.

796. TOLEDO, C. de Considerações sobre a ultraestrutura de um melanoma maligno do corpo ciliar. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 129-136, 1969.

797. VALLEJO-FREIRE, A.; OLIVEIRA F.º, B. & BRUNNER JR., A. Myxomatose experimental em *Oryctolagus sp.* e *Sylvilagus sp. Mem. Inst. Butantan, 34:* 111-120, 1969.

HISTOLOGIA

798. LOPES, R.A.; OLIVEIRA, C.; CAMPOS, G.M. & BARROS, J.M. Estudo morfológico e histoquímico da Glândula de Harder de alguns répteis brasileiros. I — Ophidea. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 41-50, 1974.

IMUNOLOGIA

799. OLIVEIRA, E.P.T. Estudos sobre a preparação de soro antibotulínico tipo A. *Mem. Inst. Butantan, 36:* 1-40, 1972.

800. SOERENSEN, B.; AMARAL, J.P.; MUTTI PEREIRA, M.M. & SILVA, M.A. Estudo comparativo da alergia tuberculínica e da proteção conferida pela vacina BCG via oral e intradérmica em cobaios. *Mem. Inst. Butantan, 35:* 95-106, 1971.

HEMATOLOGIA

801. FERRI, S.; MARTINS, L.F.; LEITE RIBEIRO, M.C. & WORSMAN, T.U. Blood proteinic picture of throughbred horses. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 171-178, 1969.

802. MARTINS, L.F.; ARANTANGY, L.R. & MEDEIROS, L.O. Relationships among performance, sex and erythrogram in throughbred horses. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 179-190, 1969.

803. SOERENSEN, B. Contribuição para o estudo do ácido bórico como antisséptico de sangue conservado. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 17-42, 1973.

VENENOS

804. BANCHER, W.; ROLIM ROSA, R. & FURLANETTO, R.S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno de *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervoso, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus 1758. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 139-148, 1973.

805. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & NAVAS, J. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos *Mus musculus* Linnaeus 1758. III — Possibilidade de determinação da DL50 através da proteção cruzada conferida por doses infra-letais de outros venenos de serpentes do mesmo gênero. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 123-130, 1973.

806. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & SIRACUSA, Y.Q. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos *Mus musculus* Linnaeus 1758. I — Fenômenos que ocorrem na tentativa de determinação da DL50. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 99-108, 1973.

807. FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 de venenos botrópicos inoculados por via venosa em camundongos *Mus musculus*

Linnaeus 1758. II — Possibilidade de determinação da DL50 através da inoculação prévia de doses infra-letais do próprio veneno. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 109-122, 1973.

808. ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, S.M.P.; SILES VILLARROEL, M. & ZELANTE, F. Contribuição ao estudo da determinação da DL50 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768) em *Mus musculus* Linnaeus 1758. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 131-138, 1973.

809. SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R.S.; ROLIM ROSA, R.; ZELANTE, F. & NAVAS, J. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. II — Análise comparativa dos componentes antigênicos comuns de seis espécies de venenos botrópicos. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 31-40, 1974.

810. SILES VILLARROEL, M.; FURLANETTO, R.S.; ZELANTE, F. & ROLIM ROSA, R. Localização do fator coagulante no espectro eletroforético do veneno de *Bothrops moojeni. Mem. Inst. Butantan, 37:* 91-98, 1973.

811. SILES VILLARROEL, M.; ROLIM ROSA, R.; FURLANETTO, R.S. & ZELANTE, F. Estudo eletroforético em "Cellogel" de venenos do gênero *Bothrops. Mem. Inst. Butantan, 37*: 83-90, 1973.

812. SILLES VILLARROEL, M.; ZELANTE, F.; FURLANETTO, R.S. & ROLIM ROSA, R. Contribuição ao estudo imunoquímico de venenos botrópicos. I — Análise comparativa dos componentes antigênicos de seis espécies de venenos frente a seus respectivos antivenenos, através das técnicas de dupla difusão e imunoeletrofore em gel de ágar. *Mem. Inst. Butantan, 38:* 13-30, 1974.

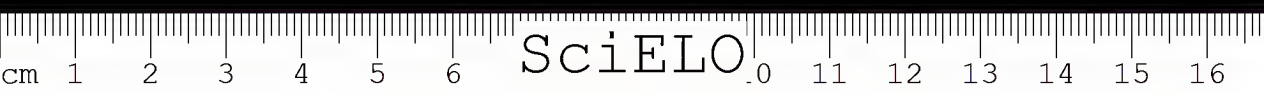
DIVERSOS

813. AMORIM, L.M. O desenho microscópico na documentação científica. Normas para seu aprendizado. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 191-208, 1969.

814. KELEN, E.M.A. Bibliografia dos trabalhos do Dr. Vital Brazil. *Mem. Inst. Butantan, 34:* 1-8, 1969.

815. PIMONT, R.P. A área de Educação do Instituto Butantan. *Mem. Inst. Butantan, 37:* 43-82, 1973.

816. ROSENFELD, G. Biografia do Dr. Vital Brazil (1865-1950). *Mem. Inst. Butantan, 34:* IX-XVI, 1969.

Mem. Inst. Butantan
39: 247, 1975

ÍNDICE DE AUTOR/AUTHOR INDEX

Mem. Inst. Butantan
39: 249-251, 1975

ÍNDICE DE ASSUNTO

Mem. Inst. Butantan
39: 249-251, 1975

Mem. Inst. Butantan
39: 253-255, 1975

SUBJECT INDEX

Mem. Inst. Butantan
39: 253-255, 1975

Mem. Inst. Butantan
39: 253-255, 1975